

**Diversitet og artssammensetning av soppendofytter i  
timotei (*Phleum pratense*) under ulike dyrkningsregimer.**

Line Christiane Alette Skogli

**Masteroppgave i økologi**



**UNIVERSITETET I OSLO  
Biologisk institutt  
Microbial Evolution Research Group (MERG)**

**Oslo 2011**



## Forord

Denne oppgaven har blitt utført i samarbeid mellom Universitetet i Oslo, Biologisk Institutt, MERG (Microbial Evolution Research Group) og Veterinærinstituttet i Oslo, seksjon for mykologi. En stor takk går til min hovedveileder Trude Vrålstad. Uten hennes kunnskap, kyndige opplæring og konstruktive tilbakemeldinger ville denne oppgaven skutt ut i helt feil vinkel.

På Blindern fortjener medveileder Håvard Kauserud takk for gode forslag. Ellers er jeg takknemlig for god hjelp fra Karl Inne Ugland og Anders Bjørnsgaard Aas under det statistiske arbeidet.

Tor Lunnan på Bioforsk i Valdres takkes for stor hjelpevilje under innsamling. Hans behjelpelighet med å peke ut timotei, som fort kan forveksles med engreverumpe (*Alopecurus pratensis*), samt hans håndlag med spade var upåklagelig.

Jeg vil takke alle på seksjon for mykologi ved Veterinærinstituttet for hyggelig selskap, og spesielt de jeg delte kontor med som også bidro med hjelp hver gang jeg hadde små og ”dumme” spørsmål.

Til slutt vil jeg takke mine gode venner for støtte og innspill, og ikke minst bidrag til en hyggeligere fritid.

Line Christiane Alette Skogli

Oslo mai 2011

*”Mushrooms on the ground are like stars in the sky”.*

Diktstrofe fra en liten folkegruppe i Indonesia, gjengitt av Tsing (2005)



## Sammendrag

*Phleum pratense* (timotei) dyrkes kommersielt som fôr til husdyr. Soppendofytter er vanlig i alle planter, der de har ulike egenskaper som kan påvirke verten samt herbivorer, for eksempel med toksiner. Kunnskapshull i forhold til deres diversitet, verter og geografisk utbredelse innen gress blir stadig tettet, men likevel vet man lite om dette hos timotei. I dette studiet ble diversitet og forekomst av soppendofytter kartlagt fra tilsynelatende friske timoteiplanter innen økologisk og konvensjonelt dyrket timotei, samt fra timotei i kulturlandskap.

Til sammen 108 planteindivider ble samlet inn i juni og august 2009 ved Bioforsk på Løken i Valdres. Aks, stengel og blad ble overflatesterilisert og podet ut på agar. Fra isolater ble ITS (internal transcribed spacer) amplifisert fra ekstrahert DNA. I Blastclust ble sekvensene gruppert i 39 ulike OTE (Operasjonell Taksonomisk Enhet) med 98 % likhet. Funksjonen Blast, i GenBank, ga en indikasjon på den taksonomiske tilhørigheten.

Totalt sett tilhørte 54,7 % av isolatene *Cladosporium* sp., innen familien *Davidiellaceae*, og deretter dominerte *Phaesophaeria* sp. (*Pleosporaceae*) og *Botrytis* sp. (*Sclerotiniaceae*). Innsamling i august ga flest isolater, der opphav fra konvensjonell og økologisk dyrkningsregime dominerte. Resultatene fra dette studiet viser at blader rommer en større diversitet av OTE sammenlignet med aks og stengel. Størst diversitet ble påvist i timotei fra økologisk habitat.

Denne studien indikerer at *Cladosporium* sp. er karakteristisk for timotei. I tillegg er det vist at timotei kan ha et bredt spekter av soppendofytter som særlig opptrer i blader. Det avdekkede antallet av soppendofytter fra de undersøkte områdene er mest sannsynlig underestimert i forhold til det reelle antallet. Sesongbaserte faktorer later til å påvirke forekomst av soppendofytter. Det samme gjelder ulike dyrkningsregimer, der tilførsel av nitrogen antageligvis gir gode betingelser for soppendofytter. En høy plantediversitet synes å gi høyere diversitet av soppendofytter enn timoteidyrking i tilnærmet monokultur. Ingen kjente toksinproduserende soppendofytter ble avdekket, og norsk dyrket timotei kan dermed antas å være godt egnet som fôrgress uavhengig av dyrkningsregime.



## **Innhold**

<b>Innholdsfortegnelse.....</b>	<b>1</b>
<b>Innledning.....</b>	<b>3</b>
Soppendofytter, historie og betydning.....	3
Betydning av soppendofytter for planter.....	4
Spredning av soppendofytter.....	6
Isolering av soppendofytter.....	7
Timotei.....	7
Hensikt med oppgaven.....	8
<b>Materialer og metoder.....</b>	<b>9</b>
Studieområde og prøvetaking.....	9
Isolering av soppendofytter.....	11
DNA isolering.....	12
PCR.....	12
Sekvensering.....	13
Sekvensanalyser.....	14
Statistiske analyser.....	15
Behandling av OTE.....	15
<b>Resultater.....</b>	<b>17</b>
Kultur- og OTE data.....	17
Taksonomisk fordeling.....	19
Dominante OTE.....	22

## Innhold

Artsantall og diversitet .....	25
Effekt av behandling.....	29
<b>Diskusjon.....</b>	<b>31</b>
Taksonomisk fordeling og dominante OTE.....	31
Fordeling av soppendofytter i ulike plantevev.....	33
Sesongvariasjon.....	34
Effekt av dyrkningsregime.....	35
Metodiske forhold.....	37
Konkluderende bemerkninger.....	38
<b>Referanser.....</b>	<b>39</b>
<b>Vedlegg.....</b>	<b>45</b>



## **Innledning**

### *Soppendofytter, historie og betydning*

Ordet "Endofytt" stammer fra de greske ordene "endo" og "phytos" som betyr henholdsvis "inne i" og "plante"(Schulz & Boyle, 2005). En endofytt er altså en organisme som lever inne i en plante. Det finnes flere definisjoner av begrepet endofytt (Hyde & Soyton, 2008), men Petrini (1991) står bak en av de mest brukte: *"Alle organismer som på et tidspunkt i sitt liv kan kolonisere plantevev uten å forårsake synlig skade på verten"*. I denne oppgaven, som omhandler soppendofytter, vil følgende definisjon av Wilson (1995) følges: *"Endofytter er sopp eller bakterier som i hele eller deler av livssyklusen invaderer vevet til levende planter og forårsaker usynlige og asymptomatiske infeksjoner inne i plantevevet, men uten å gi symptomer på sykdom."*

Det er gjort funn av soppendofytter i fossilt materiale fra så tidlig som 400 millioner år tilbake i tid (Krings *et al.*, 2007), og soppendofytter var sannsynligvis knyttet til plantene da de koloniserte landjorden (Rodriguez *et al.*, 2009). Hittil har man funnet endofytter i alle ulike arter planter som er undersøkt (Arnold & Lutzoni, 2007; Hyde & Soyton, 2008), også hos planter som lever under relativt ekstreme forhold som kaktus (Suryanarayanan *et al.*, 2005) og marine alger (Devarajan *et al.*, 2002). Nyere forskning viser at diversiteten av soppendofytter i planter generelt er stor, men arter og antall som avdekkes kan variere med metoder som benyttes (Schulz & Boyle, 2005). For eksempel vil det være enklere å avsløre langt flere arter med nye molekylære metoder, der sekvensering direkte fra plantevevet er mulig, sammenlignet med fremdyrking av isolater i laboratorium (Guo *et al.*, 2001; Higgins *et al.*, 2011). Samtidig kan det være vanskeligere å bevise at soppene som avdekkes ved direkte sekvensering faktisk er ekte endofytter, og ikke stammer fra tilfeldig overflatesopp (Schulz & Boyle, 2005; Aas, 2010). Arnold og Lutzoni (2007) refererer til at diversiteten er særlig stor i tropiske skoger, og at enkelte mener det eksisterer flere arter av soppendofytter enn det som er kjent av arter innen hele soppriket. De fleste soppendofytter som er isolert så langt tilhører gruppen sekksporesopper (Hyde & Soyton, 2008). Soppendofytter ble lenge klassifisert i to grupper; "Clavicipitoide" soppendofytter innen familien Clavicipitaceae, og "ikke-clavicipitoide" som representerer alle andre soppendofytter. Sistnevnte gruppering er nylig beskrevet og delt opp i ytterligere 3 grupper (Rodriguez *et al.*, 2009). Clavicipitoide endofytter, eller klasse 1 endofytter, er klassiske gressendofytter primært innen slekten *Epichloë* inkludert anamorfe stadier av *Neotyphodium*. De kjennetegnes blant annet ved å ha

## Innledning

et smalt spekter av verter, kolonisere skudd og jordstengel, og ha enten vertikal eller horisontal spredning. De ikke-clavicipitoide endofyttene består, som nevnt av tre klasser, der klasse 2 endofytter har et bredt spekter av verter, koloniserer skudd, røtter og jordstengel, og har horisontal og vertikal spredning. Klasse 3 og 4 har begge et bredt spekter av verter og horisontal spredning, der klasse 3 primært koloniserer skudd, mens klasse 4, også kjent som "Dark septate endophytes" (DSE) primært koloniserer planterøtter.

### *Betydning av soppendofytter for planter*

Avhengig av hvilke arter som er involvert kan en interaksjon mellom soppendofytt og plante utarte seg forskjellig. Det er beskrevet en rekke tilfeller hvor endofytter over tid kan være patogene, parasittiske, nøytrale eller mutualistiske (Schulz & Boyle, 2005). Enkelte soppendofytter opptrer som latente patogener der en frisk vertsplante ikke viser tegn til skade, men senere, for eksempel hvis verten blir stresset, går soppendofytten over i et patogent stadium som blant annet kan resultere i klorose- og nekroseflekker på bladene (Photita *et al.*, 2004). Andre arter er kjent for å gi fordeler til sine planteverter, som økt næringsopptak, økt toleranse for ulike former for stress, økt forsvar mot patogener og økt biomasse og forsvar mot beitedyr (Rodriguez *et al.*, 2009; Schulz & Boyle, 2005; Clay, 1990; Schulz & Boyle, 2005). Noen soppendofytter er i stand til å danne flere sekundære metabolitter, som for eksempel mykotoksiner inkludert alkaloider. Alkaloider er molekyler med et karbonskjelett i basis bundet til nitrogenatomer, og disse kan ha enormt mange og forskjellige kjemiske strukturer (Harborne, 1993). De positivt ladete nitrogenatomene i molekylet kan danne bindinger med negativt ladede aminosyrer, som i sin tur kan medføre forandringer i proteinstrukturer, og lede til alvorlige dysfunksjoner hos organismer som har fått i seg alkaloidet (Wink, 2008). Alkaloider smaker bittert, og de fleste herbivorer vil unngå slike smaker (Bassoli *et al.*, 2007). Ulike studier har vist at herbivore dyr fortrinnsvis velger å beite på alkaloidfrie vekster. Eksempelvis har man vist at kaniner foretrakk å beite på lupiner med lave alkaloidnivåer i et eksperiment hvor man hadde plantet lupiner som produserte lave nivåer av alkaloider side om side med vanlige lupiner med normale alkaloidnivåer (Wink, 2008). Det er ikke bare pattedyr som påvirkes. Undersøkelser har vist at insekter som gis før infisert med soppendofytter som eneste næringskilde får lavere overlevelse, lavere vektøkning, lengre larvestadium og lavere biomasse under puppestadiet enn insekter som føres med før fritt for soppendofytter (Clay *et al.*, 1985; Clay, 1988). Ettersom enkelte dyr er

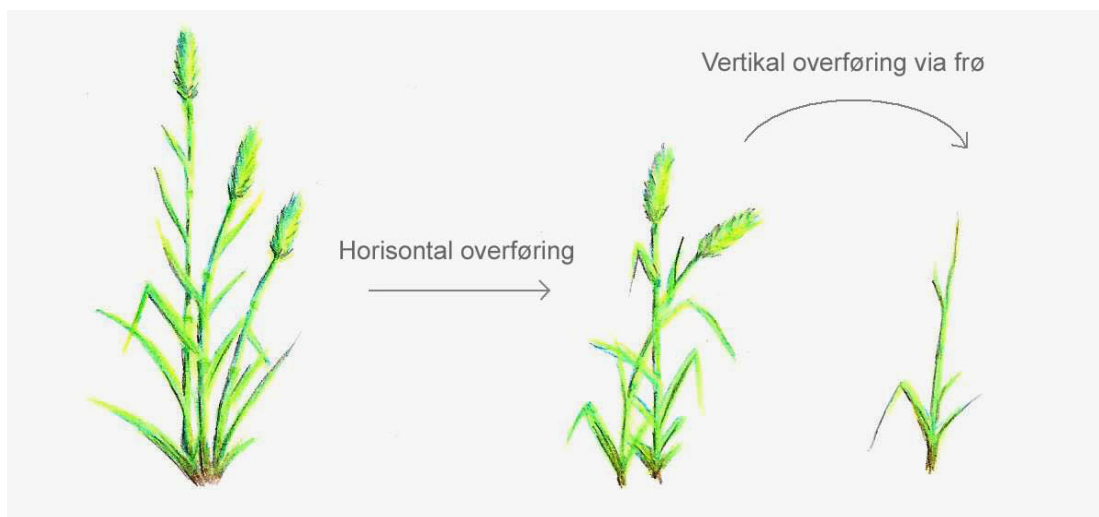
i stand til å diskriminere planter som smaker bittert, kan alkaloidproduserende soppendofytter være fordelaktig for planten da de vil gi planten økt beskyttelse mot herbivori. I tillegg er enkelte soppendofytter kjent for å øke en plantes bestandighet mot stressfaktorer som økt nedbør, tørke, varme, salt eller tungmetaller og dermed forbedre deres konkurransedyktighet (Rudgers *et al.*, 2004). Det er også vist at enkelte soppendofytter kan produsere ulike komponenter som hindrer vekst av andre sopp og bakterier *in vitro* (Ding *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2001). Videre er det vist eksempler på at sopp og plante som hver for seg ikke takler temperaturer over 40 °C, i symbiose øker toleransen for begge parter opp til 65 °C (Rodriguez *et al.*, 2009).

I gress er systemiske soppendofytter innen klasse 1 endofyttene spesielt vanlige og godt studerte: *Epichlöe* (Clavicipitaceae) og dennes anamorfe stadier av *Neotyphodium* (Rudgers *et al.*, 2009). Effekten av slike gressendofytter er som tidligere nevnt redusert beitepress på grunn av disse soppenes produksjon av alkaloider. I følge Gale *et al.* (1991) vil sauer, kyr og hester som beiter på raigras (*Lolium perenne*) infisert med soppendofytten *Neotyphodium lolii* (syn. *Acremonium lolii*) kunne bli toksinpåvirket etter 7 til 14 dager med kontinuerlig opptak. Soppendofytten produserer alkaloidet lolitrem som gir dyrene en særegen adferd med stiv, vakkende og ukoordinert gange, og i verste fall kollaps med kramper. Dette er imidlertid sjeldent alvorlig, og dyra friskner raskt til. For øvrig finnes en type gress kalt 'sleepy grass' (*Stipa robusta*) i sørvestre deler av USA. Dette gresset er infisert av toksinproduserende soppendofytter innen *Neotyphodium*, som medfører at hester som spiser dette blir døsig i flere dager (Petroski *et al.*, 1992). I arbeid av Rudgers *et al.* (2004) ble det undersøkt om soppendofytter hadde noen økologisk innvirkning på en gitt type gress. Gress infisert med soppendofytter (E+ gress) og gress uten soppendofytter (E- gress) ble sammenlignet, og de fant at E+ gress fikk bedre tilgang på resurser enn E- gress. Dette mente de kunne være en viktig faktor for sammensetningen i et samfunn, fordi E+ gress etterlot en mindre andel resurser til andre arter enn E-gress. Eksempelvis ble det forventet at E+ gress i et samfunn ville forårsake lavere biomasse blant andre plantearter. For øvrig er også det motsatte funnet, Brem og Leuchtmann (2002) fant at E- planter utelukkende omringet av E+ planter fikk større biomasse i tørrvekt enn E+ planter omringet av E- planter. På hvilken måte forholdet mellom soppendofytt og gress utarter seg vil avhenge av både abiotiske faktorer (lys, jordsmonn, næring), biotiske faktorer (konkurranse, beiting, biotoksiner), og genetiske faktorer (sopp og plantegenotyper) (Cheplick & Faeth, 2009).

## Innledning

### *Spredning av soppendofytter*

Soppendofytter har hyfer som vokser intercellulært i plantevev der de absorberer næring (Clay, 1988; Clay, 1990). Enkelte soppendofytter er også observert intracellulært (Schulz & Boyle, 2005; Solomon *et al.*, 2006; Ligrone, 1988). De kan opptre systemisk i planten, fra rotsystemet til stilk, blader og blomsterstand, eller de kan i andre tilfeller opptre kun i enkelte plantevev (Clay, 1990). Spredningen fra ett planteindivid til et annet skjer horisontalt eller vertikalt (figur 1). Horisontal spredning innebærer dannelse av seksuelle eller aseksuelle sporer på overflaten av verten eller i omgivelsene som spres og infiserer nye planteverter. Denne formen for spredning regnes som den mest vanlige, og er funnet i et bredt spekter av planter (Saikkonen *et al.*, 2004). Den horisontale spredningen via luft, vanndråper eller via insekter gjør det mulig for sporene å utvikle seg i stigma hos nye vertsplanter (Sowley *et al.*, 2010). Ved vertikal overføring vil soppendofyttene i morplanten infisere frøene, slik at den nye generasjonen av plantene allerede har med seg soppendofytter når frøene spres og nye planteindivider etableres. Det kan være interessant å merke seg at det ved vertikal overføring er et selektivt press på soppendofytter som er mindre patogene for verten enn ved horisontal overføring, sannsynligvis fordi slike soppendofytter er mer avhengig av vertens reproduktive suksess (Saikkonen *et al.*, 2004; Tintjer *et al.*, 2008).



**Figur 1:** Skjematisk fremstilling av soppendofytters spredning. Horisontal overføring involverer sporespredning via omgivelsene, mens vertikal overføring skjer via soppinfiserte frø.

### *Isolering av soppendofytter*

Den mest brukte metoden for isolering av soppendofytter er overflatesterilisering av plantevev med påfølgende poding av vevet på et tilpasset medium der soppendofyttene vokser ut og kan isoleres i renkultur for videre identifisering (Schulz & Boyle, 2005). Andre metoder involverer spesielle teknikker som farger endofyttceller slik at de kan studeres i mikroskop (Bacon & White, 1994). I nyere tid har også direkte PCR på knust plantevev med soppspesifikke primere vist seg å være effektivt og metoden kan påvise endofytter som av ulike årsaker ikke vokser i kultur (Higgins *et al.*, 2011).

### *Timotei*

Timotei (*Phleum pratense*) er en av de mest brukte gressartene innen produksjon av fôr og silo i nordiske land, samt mange andre land med kaldt maritimt klima (Höglind *et al.*, 2001). En fordel med dyrkning av timotei er at den er hardfør og kan gi gode avlinger, selv under en rekke ulike miljøforhold (Höglind *et al.*, 2001). Ifølge Havstad og Aamlid (2002) representerer kultivarene Grindstad og Vega henholdsvis den sørnorske og nordnorske varianten av timotei, hvor den nordnorske er tilpasset til å kunne gi best avling etter én innhøsting, mens den sørnorske kan gi to gode avlinger på samme sesong. Grindstad er en gammel type som er blitt benyttet kommersielt siden 1916 på grunn av sine gode avkastninger innen fôrproduksjon. Timotei vokser også vilt eller forvillet fra dyrket mark i flere typer vegetasjoner og er dermed en næringskilde for mange ville dyr og husdyr som slippes ut på sommerbeite.

Ifølge Saikkonen *et al.* (2006) har flertallet av studier på endofytter i gress fokusert på de to artene *Festuca arundinacea* (syn. *Lolium arundinaceum*; Strandsvingel) og *Lolium perenne* (Raigras). Imidlertid er det gjort studier der timotei også er inkludert. Det er blitt vist at timotei infisert med soppendofytten *Epichloë typhina* blir resistent mot den patogene soppen *Cladosporium phlei*. Dette fordi *Epichloë typhina* danner epichlicin som hemmer sporeutviklingen til *Cladosporium phlei* (Seto *et al.*, 2007). Det er også flere andre soppdrepende substanser som har blitt isolert fra *Epichloë typhina* på timotei (Tan & Zou, 2001). Timotei har dessuten vist en tendens til å inneha større genetisk diversitet av soppendofytter enn flere andre verter (Leuchtmann & Schardl, 1998). Ellers er forekomst av soppendofytter på den nært beslektede fjelltimotei (*Phleum alpinum*) studert. Studien viste at

## Innledning

forekomst var negativt korrelert med nedbørsrate, og at det kunne forklares med at soppendofytter trolig øker toleransen mot tørke i fjelltimotei (Novas *et al.*, 2007).

### *Hensikt med oppgaven*

Hovedmålet ved dette studiet er å undersøke diversiteten og sammensetningen av soppendofytter i timotei under ulike dyrkningsregimer ved bruk av klassisk kulturbasert isolering og etterfølgende molekylær identifisering av soppisolater.

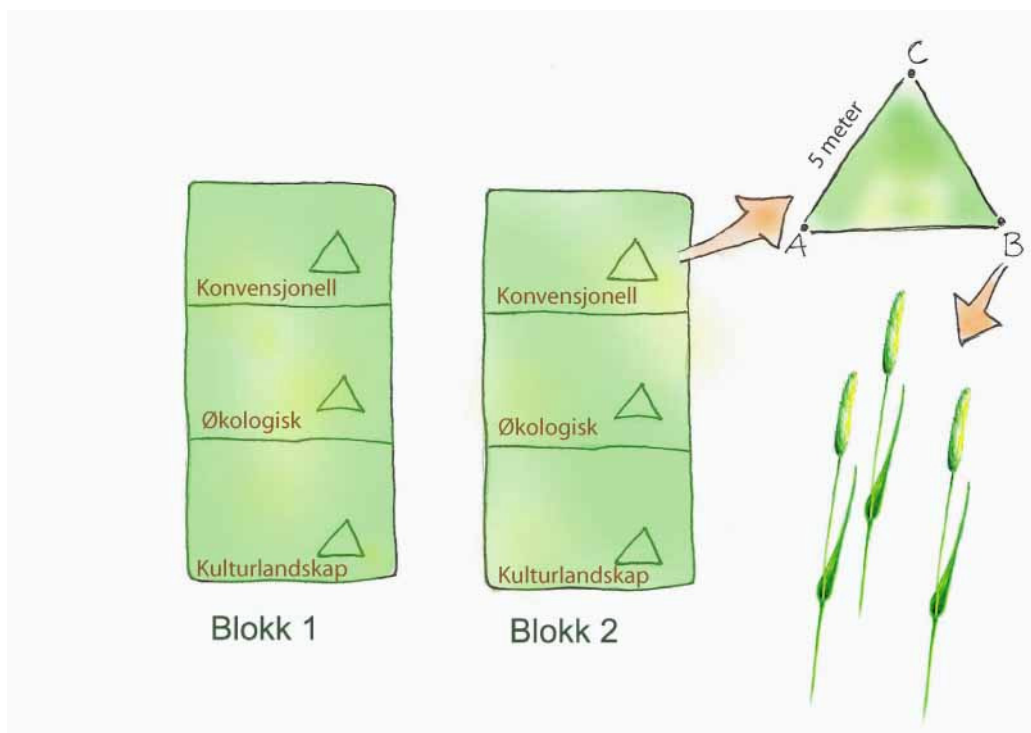
Som delmål og hypoteser vil det undersøkes om:

- Det kan påvises kjente mykotoksinproduserende soppendofytter i timotei.
- Det kan pekes ut eventuelle nøkkelarter av soppendofytter i timotei.
- Diversitet/sammensetning varierer mellom ulike timoteiplantedeler (aks, stengel og blad).
- Diversiteten av soppendofytter i timotei øker gjennom sesongen.
- Det er sammenheng mellom dyrkningsregime og diversitet/sammensetning av endofytter.
- Diversiteten av soppendofytter øker med økende plantediversitet i habitatet.

## Materialer og metoder

### Studieområde og prøvetaking

Det ble samlet inn timotei fra Bioforsk på Løken i Valdres (Oppland fylke, 530 moh) fra to parallelle områder med tre ulike habitater/dyrkningsregimer: konvensjonelt dyrket timotei, økologisk dyrket timotei og naturlig regenerert timotei i kulturlandskap (figur 2). Både konvensjonelt og økologisk dyrket timotei representerte en blanding av kultivarene Grindstad og Vega, som er vanlig å benytte til fôr dyrking. Naturlig regenerert timotei var av ukjent opphav, men kan representere de samme kultivarene som har spredt seg ut fra åker til kulturlandskap. Innsamling av hele timoteiplanter ble gjort to ganger, første gang i slutten av juni (22/6-09), rett før første innhøsting, og andre gang i slutten av august (25/8-09), rett før andre innhøsting. I august var den ene parallellen av konvensjonelt dyrket timotei allerede høstet, og nærmeste konvensjonelt dyrkede åker ble benyttet som erstatning. I tillegg ble begge kulturlandskaphabitatene slått tidligere på sommeren slik at kun blader av timotei kunne samles inn fra denne habitattypen i august.

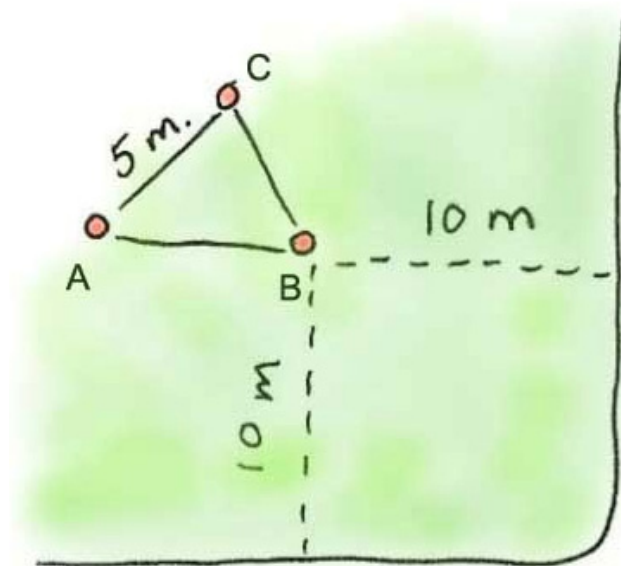


**Figur 2:** Studiedesign for de tre dyrkningsregimene konvensjonelt, økologisk og kulturlandskap. For hvert habitat ble det gjort innsamlinger fra to paralleller, blokk 1 og blokk 2. Fra alle habitater i begge paralleller ble det samlet inn totalt 9 planter fordelt på tre plot (A, B og C) som var organisert i en rettvinklet trekant (øvrige detaljer i Fig. 3).

## Materialer og metoder

De tre habitatene hadde over flere år fått følgende behandlinger: konvensjonelt dyrket åker gjødsles hver vår med 8-10 kg fullgjødsel (NKP 22-2-12) per dekar, og høstes/slås i juni og august. Økologisk dyrket åker gjødsles med 1-2 tonn husdyrgjødsel per dekar, og høstes i juni og august. Kulturlandskap gjødsles ikke, men høstes en gang i sesongen.

For å få et tilnærmet tilfeldig utvalg av timoteiindivider ble det for hver habitattype målt opp en rettvinklet trekant med 5 meters avstand mellom punktene A, B og C. Triangelet ble alltid plassert minimum 10 meter inn på åkeren for å minimere eventuell kanteffekt (figur 3). Dersom det ikke var mulig å finne et timoteiindivid på eksakt 5 meters avstand fra de andre punktene, ble det nærmeste valgt. Dette gjaldt spesielt kulturlandskap der timoteiplantene var sjeldne og mer tilfeldig fordelt.



**Figur 3:** Alle timoteiplanter ble samlet inn ved hjelp av oppmåling av en trekant med 5 meters avstand mellom punkt A, B og C. Ingen av disse punktene var nærmere kanten på åkeren enn 10 meter.

For hvert punkt (A-C) ble det spadd opp 5-10 symptomløse planteindivider inkludert deres rotsystem. Tre av disse ble senere valgt til videre arbeid. Plantene ble plassert i merkede beholdere med vann, og plassert på et kjølerom (10-15 °C) med kunstig belysning innen 5 timer etter innsamling.



### *Isolering av soppendofytter*

Individuelle planter ble delt opp i aks, stengel og blad, og disse plantedelene ble deretter overflatesterilisert separat. Stengelen ble forøvrig kuttet slik at en leddknote bidro til å tette hver side innenfor kuttflaten. Steriliseringsteknikken følger i stor grad prosedyren beskrevet i Schulz *et al.* (1993), og inkluderer vaskning i 96 % EtOH (etanol) i ett minutt, to minutter i 4,5 % NaOCl (natriumhypokloritt, Klorin fra Lilleborg), 30 sekunder i 96 % EtOH og til sist tre separate skyllinger i dH<sub>2</sub>O (autoklavert destillert vann). For å unngå krysskontaminering ble siste skyllevann skiftet mellom hvert individ, mens etanol og klorin ble skiftet mellom hvert plot (tre individer). Som kontroll på effekt av overflatesterilisering ble 1000 µl av det siste skyllevannet fordelt i en egen agarskål for å avsløre eventuell overlevelse av soppsporer. Snittflatene ble kuttet med steril skalpell ca. 1 cm inn slik at vev som kunne ha trukket til seg etanol og klorin ikke skulle hindre vekst av soppendofytter. De resterende plantedelene ble videre kuttet med steril skalpell i mindre biter på ca. 2-3 cm. Bitene ble lagt flatt i skåler med MYSA (malt yeast extract-sucrose agar, tabell V1) som også inneholdt antibiotika (Skaar & Stenwig, 1996). Til sist ble skålene forseglest med parafilm og inkubert mørkt i romtemperatur (ca 25 °C). Under steriliseringsarbeidet ble en egen MYSA-skål plassert åpent i nærheten av arbeidsområdet som luftkontroll. Denne ble forseglest med parafilm og inkubert som de andre, og ny luftkontroll ble satt ut for hver steriliseringsøkt.

Etter ni dagers inkubering ble de første koloniene av potensielle soppendofytter observert på isoleringsskålene. Tre replikabiter av mycel, som kun vokste ut fra plantevev, ble overført til PDA (potato dextrose agar, tabell V1)-skåler med steril skalpell i sterilbenk. Disse ble også forseglest med parafilm og inkubert mørkt i 20 °C. I sjeldne tilfeller der soppkolonier oppsto fritt på agarskålen ble dette antatt å representere enten luftkontaminasjon eller sekundær spredning fra kolonier knyttet til plantematerialet. Disse ble ekskludert fra videre arbeid. Isoleringsskålene ble kontrollert ukentlig i en periode på fem uker, og nye soppkolonier som stammet fra plantevevet ble suksessivt isolert i renkultur.

Etter tre til fire uker ble det fra alle renkulturer overført 2-3 mm mycel til sterile eppendorfrør for DNA ekstraksjon. For langtidslagring av isolatene ble 5-10 mycelbiter (ca 5 mm) overført til kryorør med 10 % sterilfiltrert glycerol som ble nedfrost ved -80 °C. Disse oppbevares i Veterinærinstituttets soppkultursamling "Mykotekeet".

## Materialer og metoder

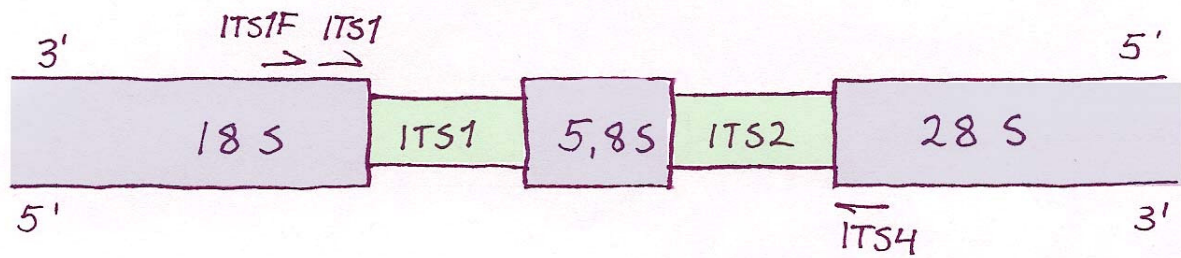
### *DNA- isolering*

Hvert eppendorfrør med mycel ble tilsatt 150 µl NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer. Mycelet ble manuelt knust ved hjelp av sterile knusestaver (micro pestle). Knusestavene var på forhånd vasket i klorin og etanol, og deretter autoklavert. Dersom noen mycelprøver var vanskelig å knuse ble disse varmet på varmeblokk og fryst i ultrafryser i henholdsvis i 10-15 min på 75 °C og 10-15 min i -80 °C. Samtlige eppendrofrør ble til slutt tilsatt 850 µl NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer slik at totalvolumet ble 1000 µl.

DNA ble ekstrahert ved bruk av NucliSENS® easyMAG® bio-robot med standard reagenser fra produsenten (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Systemet isolerer nukleinsyrer ved hjelp av magnetiske silicakuler som gjør det mulig å skylle vekk andre substanser. For hver prøve ble 1000 µl overført til maskinens respektive brønner, tilsatt 50 µl magnetiske silicakuler, og mikset ved pipettering. Det ble inkludert én negativ DNA isoleringskontroll per isoleringsrunde som inneholdt 1000 µl lysis buffer uten tilsatt mycel. DNA ble til slutt løst i 50 µl elusjonsbuffer, og oppbevart i fryser (-20 °C) frem til PCR kjøring.

### *PCR*

For oppformering av DNA ble PCR med de generelle primerne ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG- 3') og ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) benyttet. I én prøve ble ITS1 byttet ut med den soppesifikke primeren ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (Gardes & Bruns, 1993) da den andre primerkombinasjonen ga negativt resultat. Det valgte DNA segmentet som ble oppformert refereres til som ITS (internal transkribed spacer) regionen av ribosomalt DNA (rDNA) som inneholder ITS1, 5,8S, og ITS2. Dette DNA segmentet benyttes ofte som barkoding region for molekylær identifisering av sopp generelt (Seifert, 2009), (figur 4).



**Figur 4:** Internal transcribed spacer (ITS) regionen av ribosomalt sopp-DNA (rDNA). ITS1, 5,8S og ITS2 ble amplifisert under PCR av primerene ITS1, ITS4 og ITS1F.

Ferdige PCR rør (0,2 ml) i strips fra puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare illustra™), ble brukt etter produsentens anvisning. Hvert rør ble tilsatt 2 µl ufortynnet DNA, og 23 µl mastermix bestående av 3 µl av hver av primer (5 µM), og 17 µl Milli-Q H<sub>2</sub>O. Oppsettet ble kjørt på en PCR-maskin av typen DNA Engine Tetrad® Peltier Thermal Cycler (PTC-225, MJ Research, Waltham, MA, USA) etter følgende program: predenaturering ved 95 °C i 10 min, deretter 38 runder bestående av 95 °C denaturering i 1 min, 56 °C primer annealing i 46 sek, 72 °C syntese i 1 minutt. En siste forlenget syntese på 72 °C ble kjørt i 5 min før avkjøling og lagring ved 4 °C til slutt.

Alle PCR produkter (5 µl PCR produkt blandet med 2 µl DNA loading buffer) ble kontrollert på 1 % agarosegel (10 g agarosepulver løst i 100 ml 1x TBE- [Tris/Borate/EDTA] buffer) tilsatt 2,5 µl etidiumbromid. Fragmentstørrelse ble bestemt ved å sammenligne med størrelsesmarkøren pUC Mix Marker 8 ready-to-use (19-1118 bp; Fermentas; USA). Geler ble kjørt på 80 V i 45 minutter i 1xTBE buffer.

### *Sekvensering*

Samtlige PCR-produkter (5 µl) ble rensset med 2 µl ExoSAP-IT (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) og kjørt på samme PCR-maskin som beskrevet over på 37 °C i 15 minutter, deretter 80 °C i 15 minutter. Til slutt ble alle prøver fortynnet 20 ganger med milliQ-H<sub>2</sub>O og tilsatt 1 µl ITS 4. PCR produktene ble sekvensert i én retning (ITS4-primeren) på sekvenseringslaboratoriet "ABI lab" på CEES (Universitetet i Oslo) ved bruk av ABI BigDye Terminator sekvenseringsbuffer, v3.1 Cycle sequencing kit og ABI PRISM 3730 Genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### *Sekvensanalyser*

Alle sekvenser ble kvalitetssikret ved å sammenligne sekvens og sekvenskromatogram i BioEdit Alignment Editor v.7.0. (Hall, 1999). Eventuelle feil ble rettet opp dersom det var mulig å manuelt tolke kromatogrammet entydig. I enkelte tilfeller der sekvensen ikke var lesbar over et langt nok område ble motsatt retning av PCR produktet sekvensert ved bruk av ITS1 primeren, og det ble laget en konsensussekvens. Alle sekvenser ble lagt inn i en felles sekvensmatrise i BioEdit.

For å gruppere sekvensene inn i operasjonelle taksonomiske enheter (OTE) ble alle sekvensene gruppert basert på 98 % sekvenslikhet ved hjelp av Blastclust. En OTE kan dermed innlemme 2 % ulikheter som for eksempel kan ha oppstått ved feil i prosessen mot sekvenseringen, eller de kan være reelle ulikheter. Ettersom OTE inkorporerer små variasjoner som kan ignorere faktiske ulikheter mellom sekvenser er det viktig å tenke på OTE som et estimat for art.

For identifikasjon ble NCBI GenBank nucleotide BLAST benyttet, der én til to representative sekvenser fra hver OTE ble foretatt søk på. I tilfeller der likheten  $\geq 98$  % fikk OTE et taksonomisk artsnavn, mens i tilfeller der likheten  $< 98$  % fikk OTE et taksonomisk slektsnavn. For *Cladosporium* sp. og *Botrytis* sp. vet man imidlertid at ITS sekvensdata ikke er tilstrekkelig for å skille arter (Schubert *et al.*, 2007; Staats *et al.*, 2005). Dette gjelder også for mange andre sekksporesopper (Seifert, 2009). Dermed er ikke disse navngitt til art i tabell 1. Kun treff som viste til publisasjon med høyest prosent sekvenslikhet ble utvalgt til å navngi samtlige OTE.

Enkelte like OTE opptrer flere ganger fra samme kilde. For eksempel kunne OTE 1 forekomme x antall ganger fra samme blad. Om dette er reelt tilfelle av x antall uavhengige kulturer eller forårsaket av vekstvilkår som gir en tilsynelatende splittet koloni fra samme kilde er vanskelig å avgjøre. Derfor, for å utelukke en uheldig oppblåsning av dataene, ble et 0/1-datasett laget som kun tok hensyn til forekomst og fravær av de 39 OTE.

For frekvente OTE ble det laget egne sekvensmatriser hvor også sekvenser med stor grad av likhet ble hentet inn som referanser fra tilgjengelige sekvensdatabaser (EMBL/GenBank).

Matrisene ble sammenstilt ved hjelp av funksjonen ClustalW Multiple alignment i BioEdit og deretter justert manuelt. Maximum parsimoni analyser for rekonstruksjon av fylogenetisk slektskap ble kjørt i MEGA v.5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Bootstrap test med 1000 replikater ble kjørt med standardinnstillinger bortsett fra at gap ble inkludert som en egen karakter.

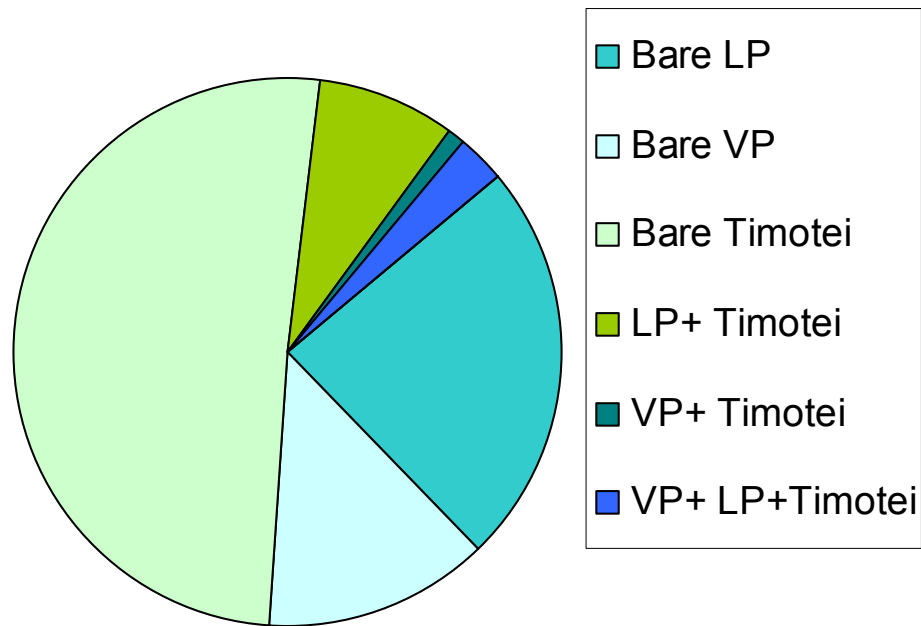
### *Statistiske analyser*

Ordinasjonsmetoden GNMDS (Generalized Non-metric Multidimensional Scaling) ble utført med R (R Core Developmental Team, 2010) på et datasett basert på forekomst og fravær av OTE i det innsamlede materialet. GNMDS ordinasjonen ble kjørt med 1000 permutasjoner der det laveste stressnivået ble valgt som beste løsning.

For å estimere hvordan antall arter øker med antallet av prøver er det vanlig å benytte randomiserte akkumuleringskurver. Disse er definert som det gjennomsnittlige antallet av arter for et gitt antall prøver. Ugland *et al.* (2003) har utviklet en analytisk metode for beregning av akkumuleringskurver basert på forekomst- og fraværdata av arter eller OTE. Denne metoden tar hensyn til at innsamlingsområdet kan være heterogent og dermed ha en ujevn utbredelse av arter. Derfor inndeles prøvene i henhold til ulike delområder. Det beregnes så en serie av akkumuleringskurver ved suksessivt å inkorporere flere og flere delområder. Kurven gjennom endepunktene for disse akkumuleringskurvene kalles TS-kurven (total species curve). Artsantallet i hele området beregnes til slutt ved ekstrapolering av regresjonslinjen gjennom disse endepunktene i et semilogaritmisk plott.

### *Behandling av OTE*

Halvparten av datamaterialet består av OTE fra isolater som ikke er påvist i verken luftkontroll eller vannkontroll (figur 5). Disse, samt OTE fra isolater som går igjen både i timoteivev og kontroller, ble det vurdert som interessante å jobbe videre med.



**Figur 5:** Skjematisk oversikt over alle OTE inndelt i kategoriene 1) Luftprøver (LP) = andel OTE kun isolert fra luftkontroller, 2) Vannprøver (VP) = andel OTE kun isolert fra vannkontroller 3) Bare timotei = andel OTE kun isolert fra timoteivev 4) LP + Timotei = andel overlappende OTE fra luftkontroller og timotei, og 5) VP + Timotei = andel overlappende OTE fra vannkontroller og timotei, og 6) LP + VP + Timotei = andel overlappende OTE fra luftkontroller, vannkontroller og timotei. Figuren er ikke basert på forekomst-og fraværdata, men faktisk antall isolater per OTE.

OTE som kun opptrer i kontroller og ikke forekommer i vev fra timotei (37 %) ble ekskludert. Videre ble OTE hvor antall kontaminantsekvenser var høyere enn antall sekvenser fra timoteiisolater også ekskludert. De OTE der antall sekvenser fra timotei isolater var vesentlig større enn antall sekvenser fra kontroller (antatte kontaminanter) ble ikke ekskludert. Her ble det vurdert som mer sannsynlig at kilden til isolater som kom opp i luft eller vannkontroll var sporer fra den påviste soppdofytten, framfor at alle isolater som vokste ut i renkultur fra sterilisert plantemateriale skulle representerte tilfeldige kontaminanter fra luft eller ufullstendig sterilisert planteoverflate.

## Resultater

### *Kultur- og OTE data*

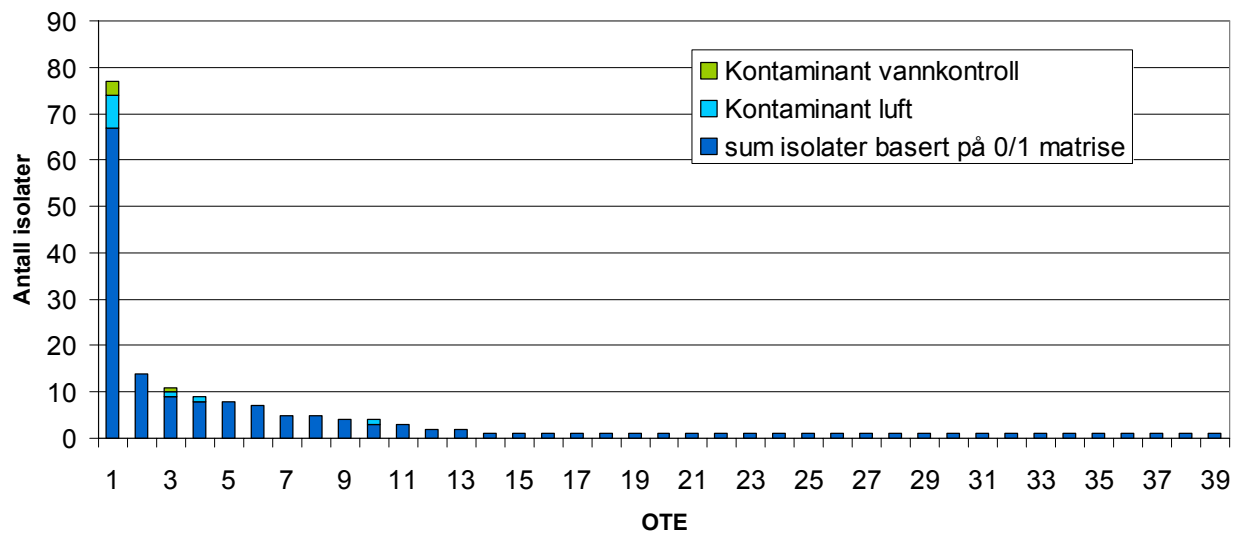
Oppvekst av soppendofytter viste seg ca. 9 dager etter overflatesterilisering. Noen timoteiplanter ga ingen endofyttisolater, mens andre ga flere. Gjennomsnittlig ble det isolert ca. 2,5 soppendofytter fra hver plante. Totalt ble det isolert 266 soppisolater fra timoteivev. Disse fordelte seg på 8 og 20 isolater fra kulturlandskap, 30 og 107 isolater fra konvensjonell åker og 3 og 98 isolater fra økologisk åker i henholdsvis juni og august.

Sekvenseringen viste alltid et fullstendig bilde av baser innefor ITS1 og 5,8S rRNA, men flere sekvenser kunne være noe ufullstendige på slutten av ITS2 regionen der flere baser kunne mangle eller var udefinerte da kun ITS4 var brukt som sekvenseringsprimer. Sekvensene ble likevel vurdert som tilstrekkelige for videre identifisering.

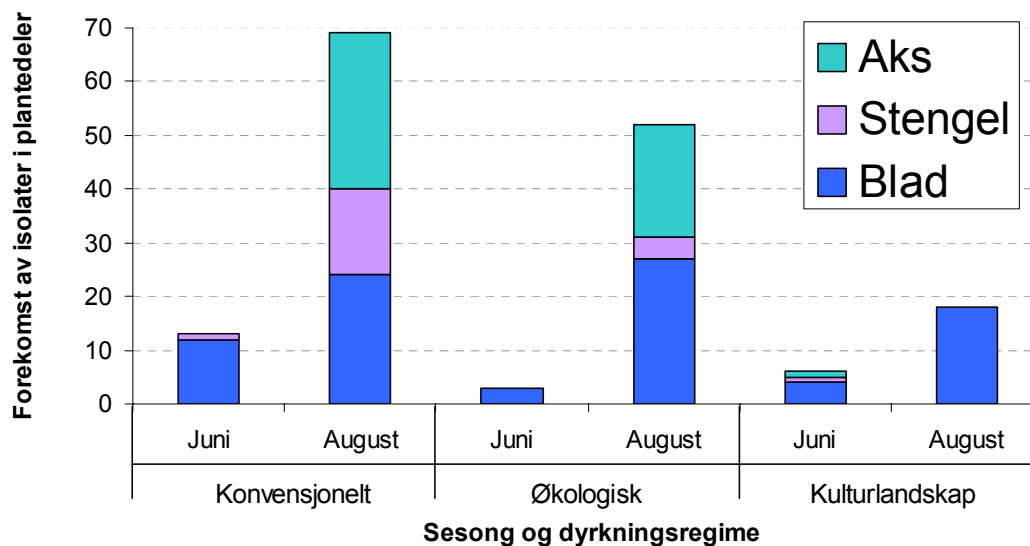
Clusteranalyser i BlastClust av ITS-sekvenser fra alle isolater resulterte i 75 OTE. Av disse stammet 51 % av isolatene kun fra timoteivev, 11 % var isolater i kontroller man også fant i timoteivev og 37 % ble isolert kun fra kontroller (figur 5). Fra videre analyser ble 36 OTE ekskludert (se materialer og metoder), mens 39 OTE ble analyser videre. Frekvensfordelingen av disse er vist i figur 6. På grunnlag av forekomst- og fraværdata ble 26 av de 39 OTE kun isolert en gang (singeltons), mens 13 ble isolert to eller flere ganger. Alle 39 OTE ble identifisert som sekksporesopp og deres taksonomiske tilhørighet er listet i tabell 1. Den vanligste slekten var *Cladosporium* sp. (teleomorph: *Davidiella*). Ellers var slektene *Botrytis* sp. (telimorph: *Botryotinia*), og *Stagonospora* sp. (teleomorph: *Phaeosphaeria*) godt representert i tillegg til *Phoma* sp. (telimorph: *Didymella*).

Figur 7 gir en oversikt over frekvens av isolater basert på forekomst og fravær av OTE per plantedel fra de ulike dyrkningsregimene. Denne viser at blader fra konvensjonell åker hadde høyest frekvens av isolater i juni, mens i august har aks og blader fra henholdsvis konvensjonell og økologisk åker høyest frekvens av isolater.

## Resultater



**Figur 6:** Frekvensfordeling av alle inkluderte OTE basert på forekomst og fravær i plantevev (aks, stengel, blad).

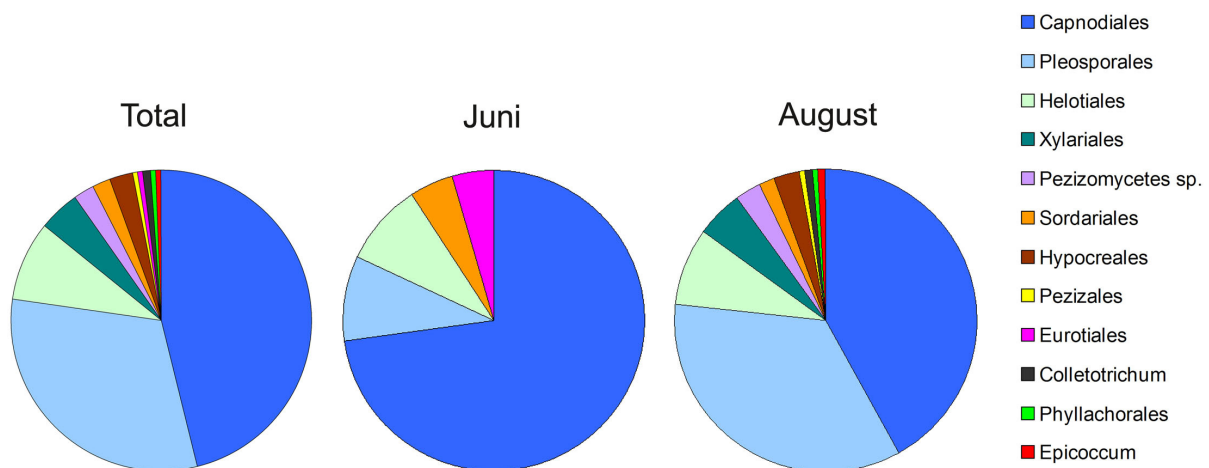


**Figur 7:** Frekvens av isolater i plantevev av timotei i juni og august fra tre ulike dyrkningsregimer (konvensjonell og økologisk åker og kulturlandskap) basert på forekomst og fravær av OTE per plantevev (aks, stengel og blad). Aks for konvensjonelt dyrket timotei, og aks og stengel for økologisk dyrket timotei fra juniprøvene ga ikke opphav til soppisolater. Aks og stengel ble ikke undersøkt fra kulturlandskapet i august da kun blader var tilgjengelig her

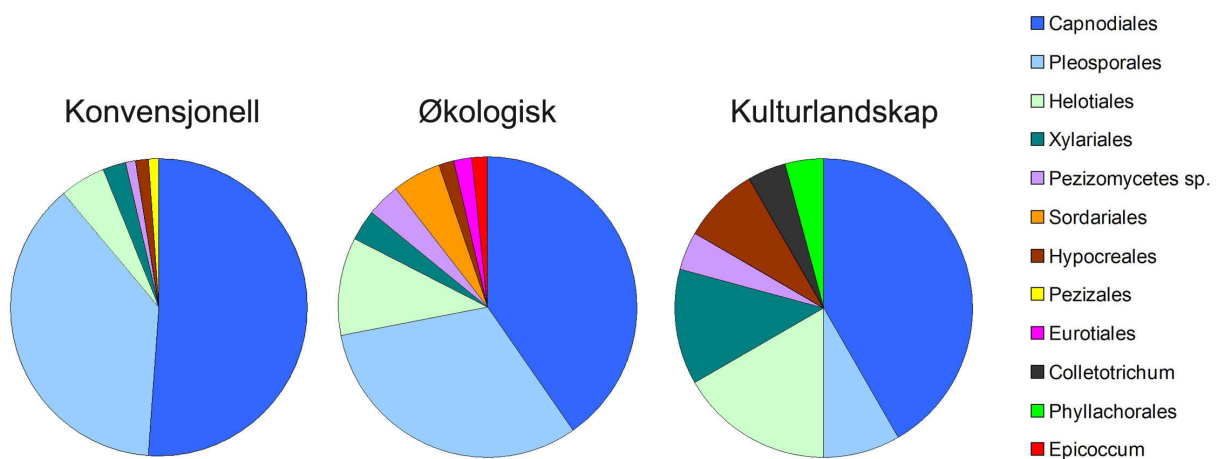


### Taksonomisk fordeling

Den taksonomiske fordelingen av isolater funnet i juni og august på ordensnivå, samt total taksonomisk fordeling, er angitt i figur 8 på basis av forekomst- og fraværdata. Totalt sett var ordnene Capnodiales, Pleosporales og Helotiales de mest frekvente og utgjorde henholdsvis 45 %, 31 % og 9 % av alle OTE.



**Figur 8:** Taksonomisk fordeling av OTE på ordensnivå, både totalt og splittet opp for juni og august. Der ordensnavn er ukjent er slekt oppgitt. Der også slekt er ukjent er klasse oppgitt.



**Figur 9:** Taksonomisk fordeling av isolerte soppisolater fra timotei fra henholdsvis konvensjonelt dyrket åker, økologisk dyrket åker og kulturlandskap..

## Resultater

**Tabell 1. Taksonomisk tilhørighet av OTE 1-39 basert på beste BLAST treff i GenBank.**

OTE nummer og navn <sup>1</sup>		Beste treff (% SL) <sup>2</sup>	Aksesjon <sup>3</sup>	Orden	Klasse	#ISO <sup>4</sup>	Forekomst juni <sup>5</sup>			Forekomst august <sup>5</sup>		
							K	U	Ø	K	U	Ø
1	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Davidiella tassiana</i> (100)	EF679359	Capnodiales	Dothideomycetes	67(140)	11(18)	4(5)	1(1)	24(54)	5(7)	22(55)
2	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> (96)	AF321323	Pleosporales	Dothideomycetes	14(26)	1(11)	0	0	11(13)	0	2(2)
3	<i>Botrytis</i> sp.	<i>Botryotinia fuckeliana</i> (99)	GQ221115	Helotiales	Leotiomyces	9(18)	0	0	0	4(5)	0	5(13)
4	<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma paspali</i> (94)	FJ427048	Pleosporales	Dothideomycetes	8(8)	0	0	0	2(2)	1(1)	5(5)
5	<i>Mycosphaerella graminis</i>	<i>Mycosphaerella graminis</i> (99)	GU214666	Capnodiales	Dothideomycetes	8(9)	0	0	0	7(8)	1(1)	0
6	<i>Drechslera phlei</i>	<i>Drechslera phlei</i> (99)	AY004807	Pleosporales	Dothideomycetes	7(8)	0	0	0	5(6)	0	2(2)
7	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	<i>Phaeosphaeria caricinella</i> (97)	AF439475	Pleosporales	Dothideomycetes	5(7)	0	0	0	5(7)	0	0
8	<i>Alternaria infectoria</i>	<i>Alternaria infectoria</i> (98)	EF104194	Pleosporales	Dothideomycetes	5(6)	0	0	0	2(2)	0	3(4)
9	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Bipolaris sorokiniana</i> (99)	EF452447	Pleosporales	Dothideomycetes	4(4)	0	0	0	2(2)	0	2(2)
10	<i>Monographella nivalis</i>	<i>Monographella nivalis</i> (99 %)	AB272124	Xylariales	Sordariomycetes	3(4)	0	0	0	1(2)	2(2)	0
11	<i>Pezizomycetes</i> sp. 1	<i>Pezizomycetes</i> sp. (97)	GQ153175		<i>Pezizomycetes</i>	3(4)	0	0	0	1(1)	0	2(3)
12	<i>Coniothyrium</i> sp.	<i>Coniothyrium</i> sp. (99)	AJ293812	Pleosporales	Dothideomycetes	2(2)	1(1)	0	0	1(1)	0	0
13	<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Fusarium avenaceum</i> (99)	FJ603000	Hypocreales	Sordariomycetes	2(2)	0	0	0	0	1(1)	1(1)
14	<i>Podospora</i> sp.	<i>Podospora</i> sp. (98)	AM262360	Sordariales	Sordariomycetes	1(2)	0	0	0	0	0	1(2)
15	<i>Phialocephala dimorphospora</i>	<i>Phialocephala dimorphospora</i> (98)	AY606304	Helotiales	Leotiomyces	1(2)	0	1(2)	0	0	0	0
16	Helotiales sp.	<i>Dimorphospora foliicola</i> (90)	GQ411315	Helotiales	Leotiomyces	1	0	0	0	0	1	0
17	<i>Leptodontidium</i> sp. 1	<i>Leptodontidium orchidicola</i> (95)	AF486133	Helotiales	Leotiomyces	1	0	0	0	0	1	0
18	<i>Oculimacula</i> sp	<i>Oculimacula yallundae</i> (96)	AY266169	Helotiales	Leotiomyces	1	0	1	0	0	0	0
19	<i>Leptodontidium</i> sp.2	<i>Leptodontidium orchidicola</i> (93)	AF486133	Helotiales	Leotiomyces	1	0	0	0	0	0	1

20	<i>Peziza</i> sp	<i>Peziza ampliata</i> (97)	AF491592	Pezizales	Pezizomycetes	1	0	0	0	1	0	0
21	<i>Xylaria</i> sp	<i>Xylaria castorea</i> (89)	GU324751	Xylariales	Sordariomycetes	1	0	0	0	1	0	0
22	<i>Phaeosphaeria herpotrichoides</i>	<i>Phaeosphaeria herpotrichoides</i> (99)	AF439483	Pleosporales	Dothideomycetes	1	0	0	0	0	0	1
23	<i>Nemania</i> sp.	<i>Nemania aenea</i> (97)	AF201704	Xylariales	Sordariomycetes	1	0	0	0	0	0	1
24	<i>Pezizomycetes</i> sp. 2	<i>Pezizales</i> sp. (86)	AJ969618		Pezizomycetes	1	0	0	0	0	1	0
25	<i>Hypoxylon</i> cf. <i>serpens</i>	<i>Hypoxylon serpens</i> (98)	HM036598	Xylariales	Sordariomycetes	1	0	0	0	0	0	1
26	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Chaetomium globosum</i> (99)	AB449670	Sordariales	Sordariomycetes	1	0	0	0	0	0	1
27	<i>Penicillium olsonii</i>	<i>Penicillium olsonii</i> (99)	EF634440	Eurotiales	Eurotiomycetes	1	0	0	1	0	0	0
28	<i>Phoma herbarum</i>	<i>Phoma herbarum</i> (98)	AY337712	Pleosporales	Dothideomycetes	1	0	0	0	0	0	1
29	<i>Colletotrichum graminicola</i>	<i>Colletotrichum graminicola</i> (99)	DQ003106	<i>Incertae sedis</i>	Sordariomycetes	1	0	0	0	0	1	0
30	<i>Drechslera tritici-repentis</i>	<i>Drechslera tritici-repentis</i> (100)	EF452489	Pleosporales	Dothideomycetes	1	0	0	0	1	0	0
31	<i>Schizothecium</i> sp.	<i>Schizothecium carpinicola</i> (95)	AY999118	Sordariales	Sordariomycetes	1	0	0	1	0	0	0
32	<i>Drechslera biseptata</i>	<i>Drechslera biseptata</i> (98)	AY004788	Pleosporales	Dothideomycetes	1	0	0	0	0	0	1
33	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp. (98)	EF601641	Hypocreales	Sordariomycetes	1	0	0	0	1	0	0
34	<i>Hirsutella kirchneri</i> .	<i>Hirsutella kirchneri</i> (99)	EF194154	Hypocreales	Sordariomycetes	1	0	0	0	0	1	0
35	<i>Phoma exigua</i>	<i>Phoma exigua</i> (99)	GU237754	Pleosporales	Dothideomycetes	1	0	0	0	0	1	0
36	<i>Plectosphaerella</i> sp.	<i>Plectosphaerella cucumerina</i> (97)	HM216207	Phyllachorales	Sordariomycetes	1	0	0	0	0	1	0
37	<i>Preussia dubia</i>	<i>Preussia dubia</i> (100)	GQ203777	Pleosporales	Dothideomycetes	1	0	0	0	0	0	1
38	<i>Microdochium phragmitis</i>	<i>Microdochium phragmitis</i> (98)	AJ279449	Xylariales	Sordariomycetes	1	0	0	0	0	1	0
39	<i>Epicoccum purpurascens</i>	<i>Epicoccum purpurascens</i> (99)	FJ426998	<i>Incertae sedis</i>	Dothideomycetes	1	0	0	0	0	0	1

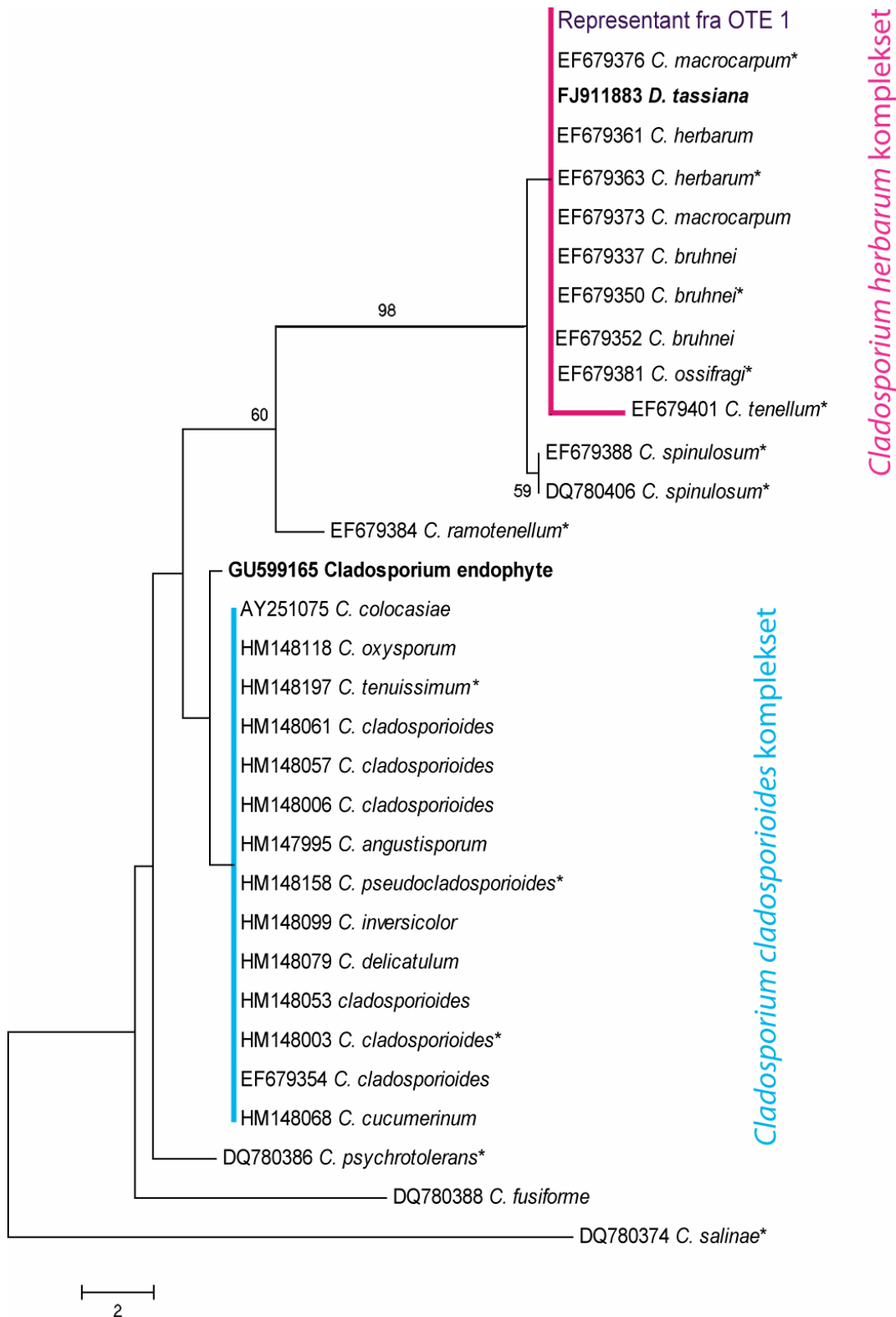
<sup>1</sup> OTE = Operasjonell taksonomisk enhet nummer. <sup>2</sup> Prosentvis sekvenslikhet (tall i parentes = %) med beste Blast treff (= angitt takson navn i GenBank). <sup>3</sup> EMBL/GenBank aksjesjonsnummer for beste Blast treff av annotert, troverdig sekvens. <sup>4</sup> Antall isolater fra plantevev av den enkelte OTE. <sup>5</sup> Forekomst av den enkelte OTE i de ulike habitat/dyrkningstypene (K = konvensjonelt dyrket, U = kulturlandskap, Ø = økologisk dyrket) for juni og august. Tall i små typer i parentes er faktiske antall isolater, mens vanlige tall baserer seg på forekomst- og fraværdata.

## Resultater

Figur 9 illustrerer den taksonomiske fordelingen på ordensnivå mellom de ulike dyrkningsregimene basert på forekomst- og fraværdata. Capnodiales dominerte innen alle tre dyrkningsformer og utgjorde 52 % i konvensjonelt regime, 39 % i økologisk regime og 42 % av alle OTE i kulturlandskap. Helotiales kom deretter som den nest vanlige ordenen i kulturlandskap, mens Pleosporales var nest vanligst i konvensjonell og økologisk åker.

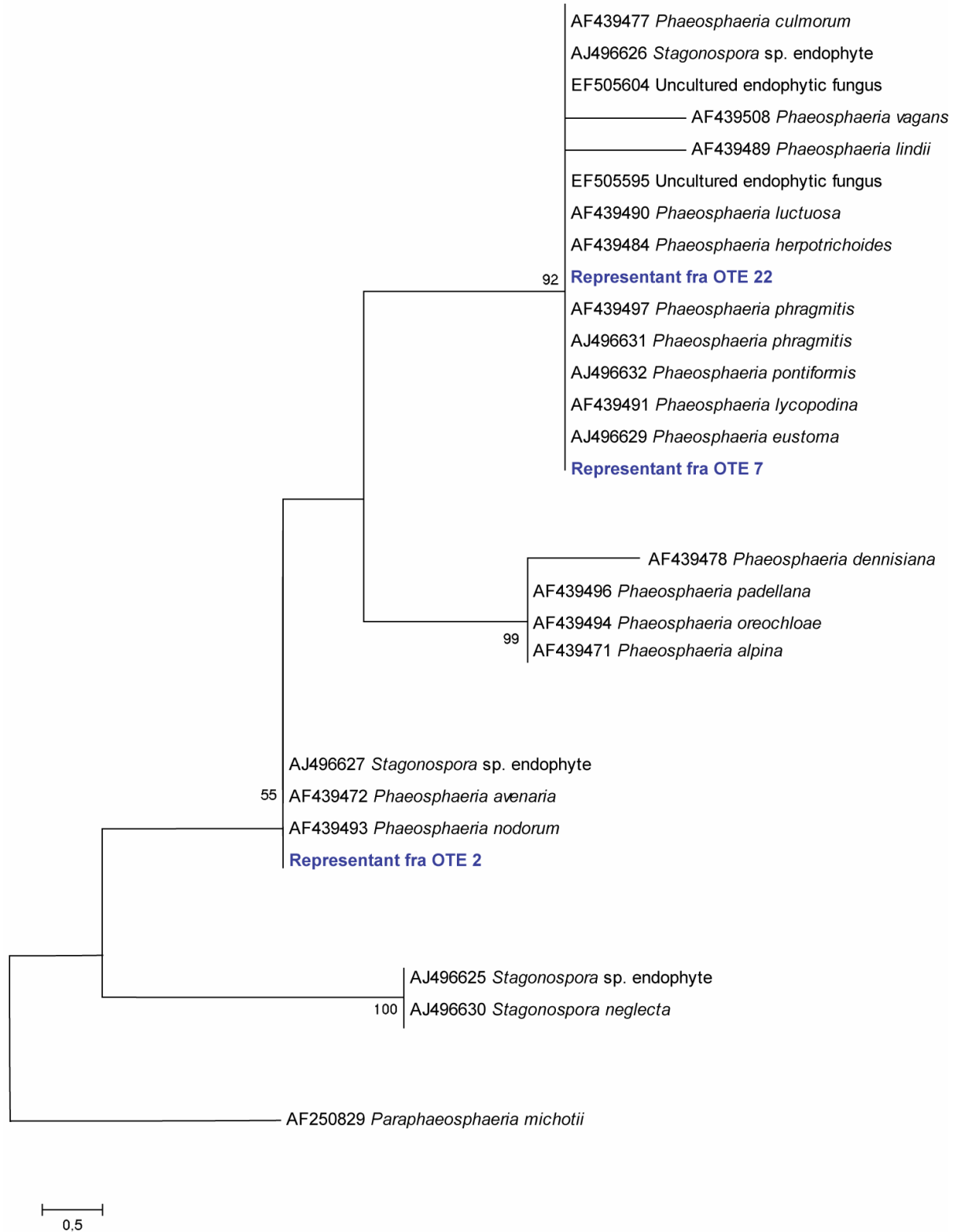
### *Dominante OTE*

Den taksonomiske tilhørigheten for de mest frekvente OTE, *Cladosporium* sp. og *Phaeosphaeria* sp. ble undersøkt ved hjelp av maximum parsimoni analyser av sekvenser samt relevante referansesekvenser (tabell V2) hentet fra GenBank (figur 10 og 11). Alle isolater av OTE 1 (*Cladosporium* sp.) hadde identiske ITS-sekvenser og grupperte med 98 % bootstrap støtte innen *Cladosporium herbarum* komplekset, som består av artene *C. herbarum* (teleomorf = *Davidiella tassiana*), *C. brunhei*, *C. macrocarpum*, og *C. ossifragi* (Schubert *et al.*, 2007). Isolater innen *Phaeosphaeria* sp. / *Stagonospora* sp., representert av OTE 2 grupperte med artene *P. avenaria* og *P. nodorum*, med 55 % støtte, mens representanter fra OTE 22 og 7 grupperte med varierende arter med 92 % støtte.



**Figur 10:** Maximum parsimoni tre basert på ITS sekvenser av OTE1 fra dette arbeidet (i lilla) og GenBank referansesekvenser fra relevante *Cladosporium* arter (se tabell V2). Bootstrapverdier  $\geq 50$  % er indikert ved forgreninger og representerer 1000 replikater. Isolater merket med \* angir ex-type, mens isolater i fete typer er bekreftede soppendofytter. *Cladosporium salinae* er benyttet som utgruppe. Samtlige isolater i denne studien faller inn under *Cladosporium herbarum* komplekset med 98 % støtte (merket rosa).

## Resultater



**Figur 11:** Maximun parsimoni tre med representative sekvenser fra dette arbeidet (i fete typer) fra OTE 2, OTE 7 og OTE 22, og GenBank referansesekvenser fra relevante *Phaeosphaeria* / *Stagonospora* arter (tabell V2). Bootstrapverdier  $\geq 50$  % er indikert ved forgreninger og representerer 1000 replikater. *Paraphaeosphaeria michotii* er benyttet som utgruppe.

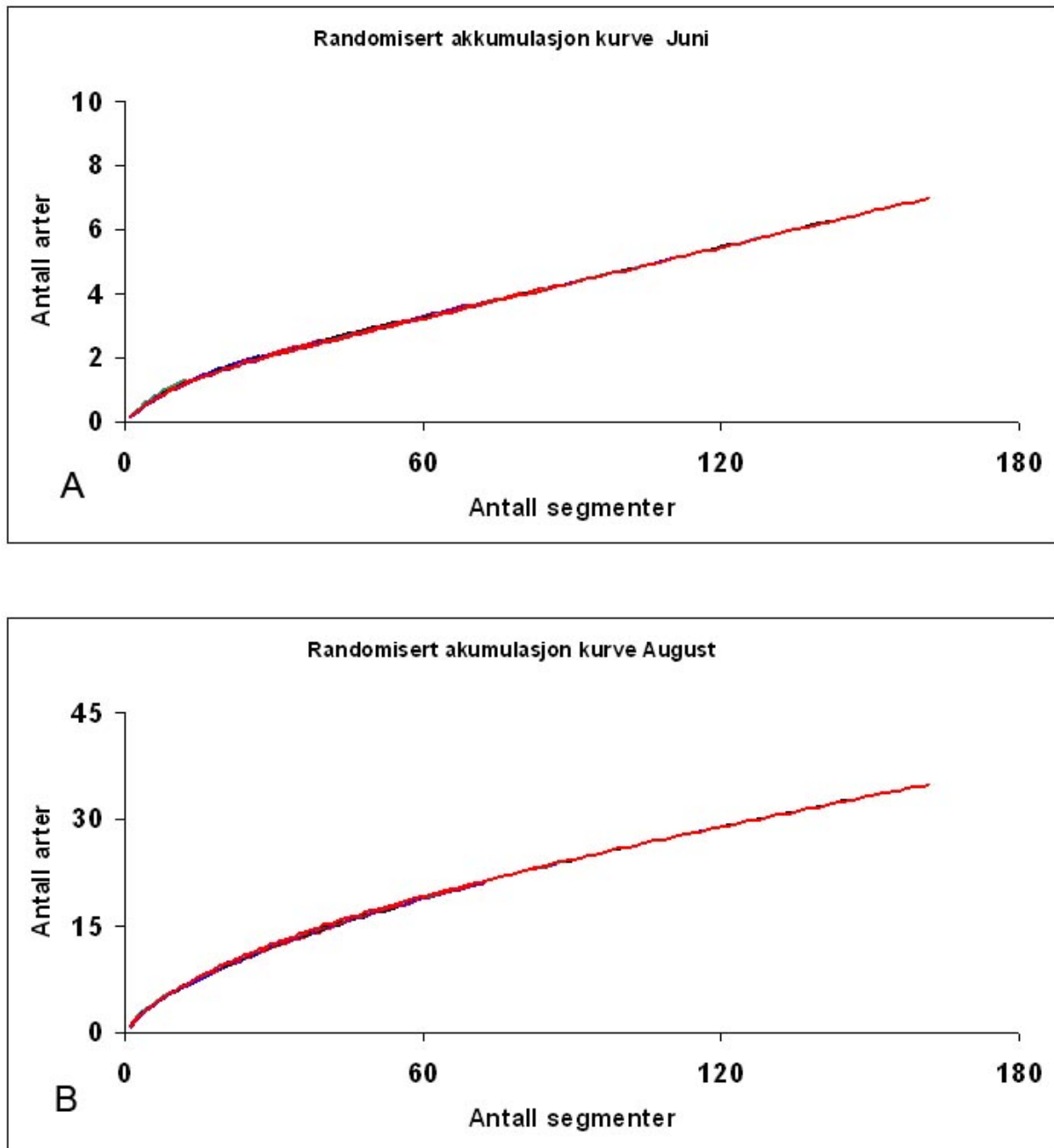
*Artsantall og diversitet*

De randomiserte akkumulasjonskurvene viser en jevn økning av artsantallet med voksende antall av undersøkte segmenter (162 stk.) av timotei (figur 12). Det ble observert stor forskjell i artsrikdom mellom juni og august. I prøvene fra juni var det 7 OTE, og i prøvene fra august ble det observert 35 OTE. Siden den siste halvdel av akkumuleringskurven for begge sesongene er tilnærmet lineær, er det rimelig å anta at det faktiske artsantallet i det omliggende økosystemet er langt større. På grunnlag av total arts (T-S) kurve (ikke vist) kan en ekstrapolering av akkumulasjonskurvene gjøres for å estimere den totale mengde av OTE i undersøkelsesområdet. Dersom 10 000 000 timoteiplanter utgjør samtlige timoteiplanter i hele området, ville det, i følge metoden til Ugland (2003), være 91 OTE i juni og 458 OTE i august (tabell 2), det vil si en femdobling av antall OTE fra juni til august.

**Tabell 2: Estimerte antall OTE for juni og august i alle tre dyrkningsregimer ekstrapolert ved hjelp av T-S kurven.**

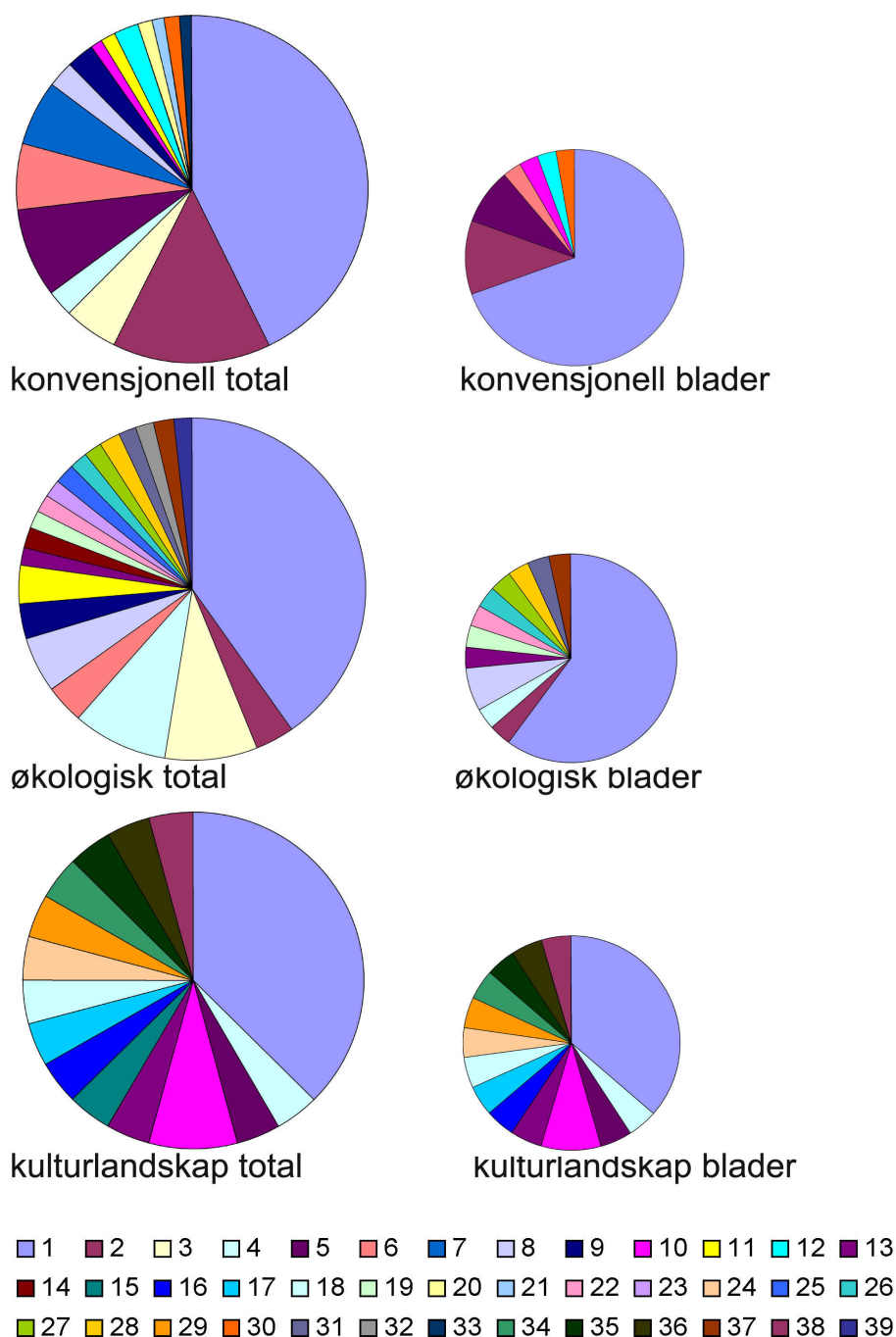
Antall timotei	Antall segmenter	Antall OTE juni	Antall OTE august
10 000	30 000	~33	~166
100 000	300 000	~53	~266
1 000 000	3 000 000	~65	~332
10 000 000	30 000 000	~91	~458

OTE 1 dominerte innen alle tre åkertyper med en opptreden på 43 % (35 forekomster) i konvensjonelt dyrket timotei, 38 % (9 forekomster) i timotei fra kulturlandskap og 40 % (23 forekomster) i økologisk dyrket timotei, basert på forekomst/fravær data (figur 13). Det største mangfoldet forekom ved økologisk dyrkningsmetode der 21 OTE ble observert sammenliknet med 16 ved konvensjonell dyrkningsmetode, og 15 i kulturlandskap.



**Figur 12:** Arts akkumulasjonskurver basert på OTE data fra juni (a) og august (b) der antall OTE er plottet mot antall analyserte plantesegmenter (aks, stengel og blad). De varierende kurvene som kan skimtes med ulike farger representerer uavhengige akkumulasjonskurver kalkulert med ulike innsamlingsstørrelser.

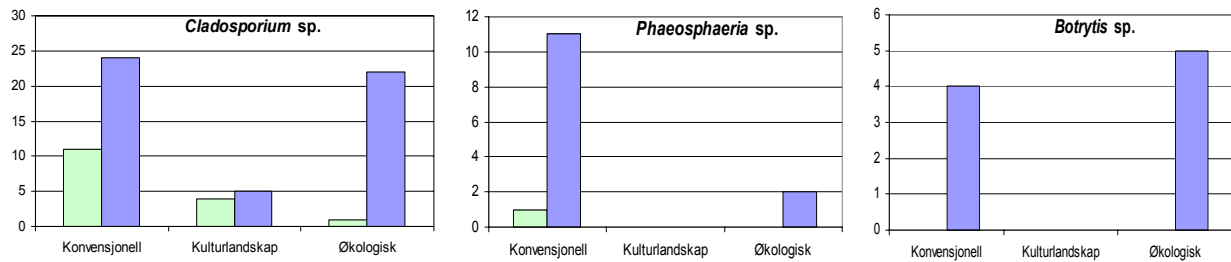




**Figur 13:** Fordelingen av de 39 OTE i konvensjonelt dyrket timotei, økologisk dyrket timotei og timotei fra kulturlandskap. De mindre kakediagrammene gir samme informasjon kun for blader.

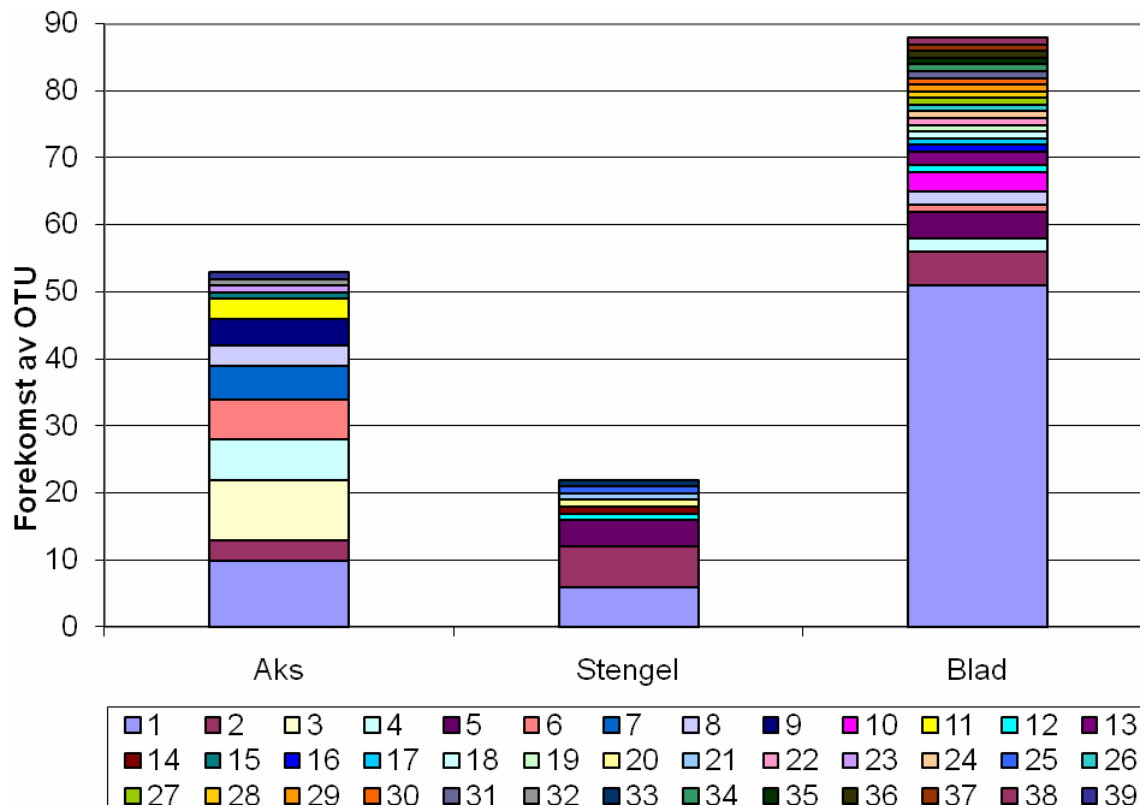
Fordelingen av de tre hyppigste isolatene vises i figur 14. *Cladosporium* sp. var hyppigst i timotei fra konvensjonell og økologisk dyrkning, *Phaeosphaeria* sp. var hyppigst fra konvensjonell dyrkning, mens *Botrytis* sp. var hyppigst fra økologisk og konvensjonelt dyrket timotei. Av disse artene ble kun *Cladosporium* sp. isolert fra kulturlandskap.

## Resultater



**Figur 14:** De tre mest frekvente OTE og deres fordeling mellom de tre dyrkningsregimene (basert på forekomst/fravær data). Y-aksen angir antall forekomster, mens X-aksen angir dyrkningsregime. Grønne søyler er data fra juni, mens søyler i blått er data fra august. *Cladosporium* sp. opptrer hyppigst fra konvensjonell og økologisk dyrkning i august. *Phaeosphaeria* sp. er hyppigst i konvensjonelt dyrkningsregime i august, mens *Botrytis* sp. er hyppigst i økologisk dyrkning. Sistnevnte to arter var begge fraværende i kulturlandskap (kun blader for august). Merk ulik skalering på Y-aksen.

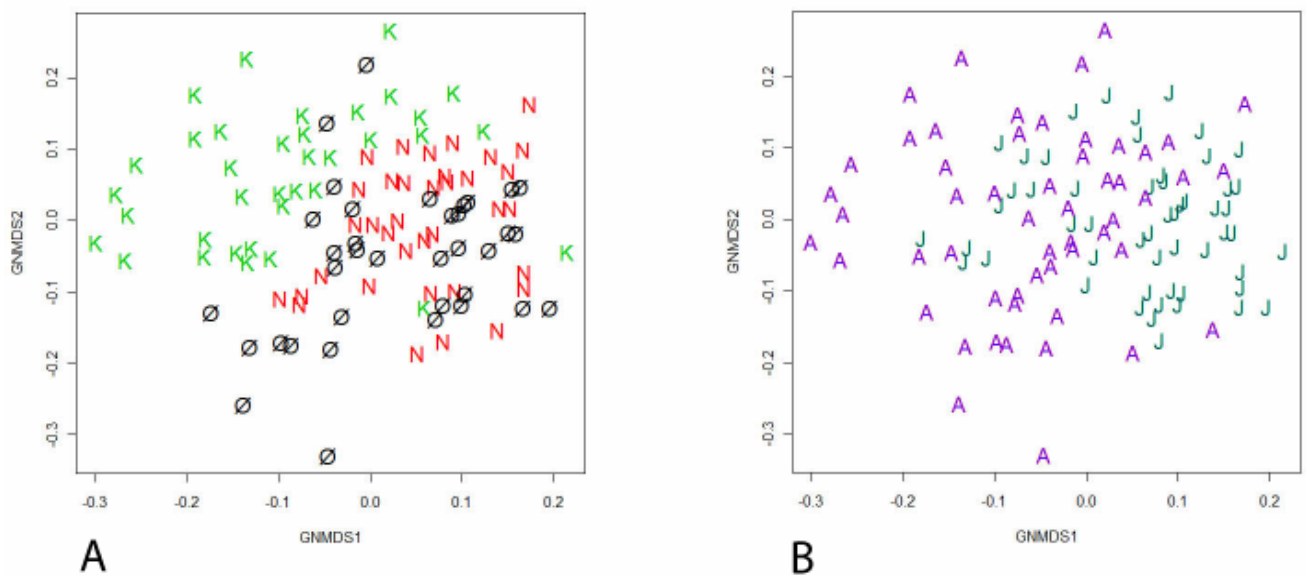
Fordelingen av OTE var ulik mellom aks, stengel og blad. OTE 1 (*Cladosporium* sp.) dominerte i alle tre segmenter, men mangfold og forekomst var desidert størst i blader. Lavest forekomst ble påvist i stengel (figur 15 og figur V1).



**Figur 15:** Fordeling av OTE innen de ulike plantedelene basert på forekomst- og fraværdata per plantedel.

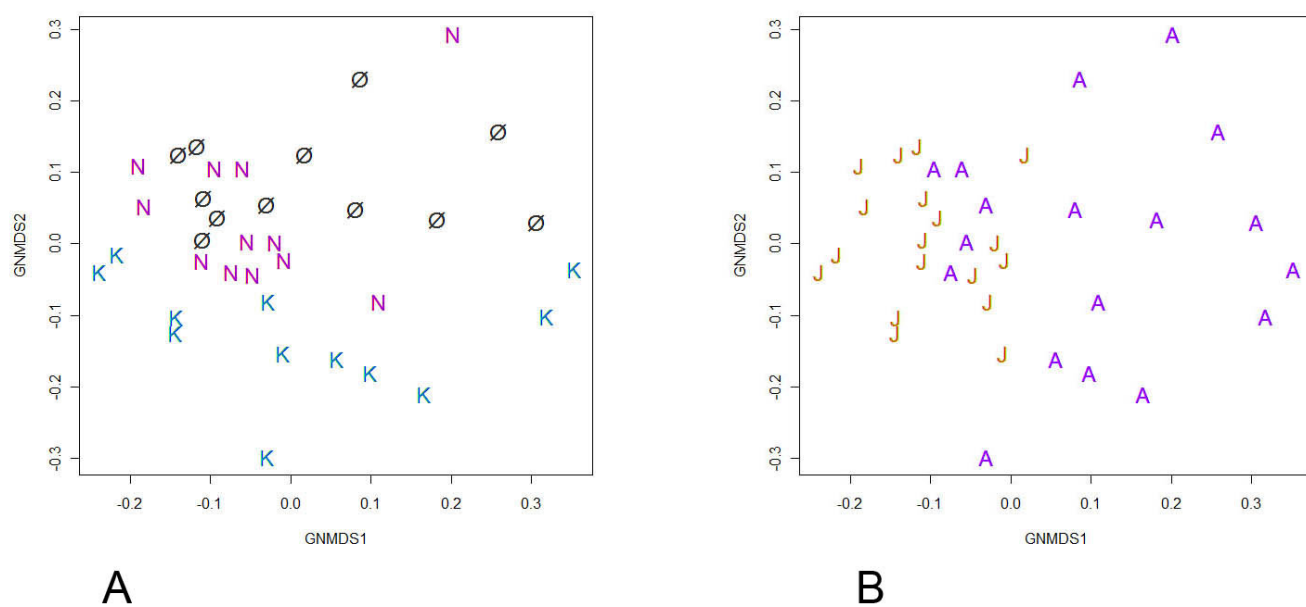
*Effekt av behandling*

På basis av forekomst- og fraværssdatasettet ble det gjort en GNMDs ordinasjonsanalyse for å visualisere variasjonen av OTE innen og mellom de ulike dyrkningsregimene (her referert til som behandlinger). Fordeling av de 108 plantene i lys av behandling (konvensjonell, økologisk og kulturlandskap) vises i figur 16. Sammensetninger av OTE i de ulike planter varierte i noen grad i henhold til behandling. Det ses også en mindre forskjell hvor plantene viser en svak fordeling i forhold til sesong langs førsteaksen (figur 16 b). GNMDs ordinasjon av alle 36 plottene vises i figur 17. Langs akse 2 kan man se et skille som indikerer at sammensetningen av sopp innen konvensjonell dyrkning er mer forskjellig sammenliknet med sammensetningen av sopp i kulturlandskap og økologisk dyrking (figur 17 a). Man kan også se at plottene analysert i juni skiller seg fra de analysert i august langs akse 1 (figur 17 b).



**Figur 16:** GNMDs ordinasjon av de 108 plantene. **A)** Variasjon i sammensetningen av OTE innen de ulike dyrkningsregimer vises (K = konvensjonell, Ø = økologisk og N = kulturlandskap). **B):** Variasjon i sammensetning av OTE mellom sesong vises (J = juni og A = august for de samme punktene som i a)).

## Resultater



**Figur 17:** GNMDS ordinasjon av de 36 plottene. **A)** Variasjon i sammensetning av OTE innen de ulike dyrkningsregimene (K =konvensjonell, Ø = økologisk og N = kulturlandskap). **B)** Innsamlingstidspunkt (J= juni og A = august) forpunktene i **a**).

## Diskusjon

Endofyttisk sopp i timotei (*Phleum pratense*) viser seg å være særlig dominert av én OTE, med arter innen *Cladosporium herbarum* komplekset. Et større antall OTE opptrer kun i beskjedne mengder. Alle OTE ble identifisert som sekksporesopper og ordenene Capnodiales, Pleosporales og Helotiales var de dominerende. Sammenlignet med juni var antall isolater fra august i flertall, men begge sesongene ga en relativt høy isoleringsfrekvens fra konvensjonell åker. Det største mangfoldet av OTE sett under ett kunne observeres hos timotei fra økologisk åker. Det ble ikke funnet potensielt toksinproduserende soppendofytter innen familien *Clavicipitaceae*. Det totale artsantallet av soppendofytter i de undersøkte områdene er sannsynligvis langt større enn det som ble avdekket i denne oppgaven. Dette indikeres av akkumulasjonskurvene (figur 12) som ikke viser noen trend til asymptote. Mine funn utgjør ca 7,65 % av det estimerte totale artsantallet for begge sesongene, og en mer intensiv innsamling ville være nødvendig for å fange opp et mer reelt antall arter.

### *Taksonomisk fordeling og dominante OTE*

I dette studiet ble det ikke påvist noen av de klassiske toksinproduserende gressendofyttene innen *Clavicipitaceae*. Derimot peker studiet ut arter innen Capnodiales, Pleosporales og Helotiales som viktige endofyttkandidater i timotei. Disse ordenene dominerer jevnt innen alle dyrkningsregimer og i begge sesonger. Det ble kun isolert OTE tilhørende sekksporesopper, og dette ser også ut til å dominere mange andre studier, selv om enkelte studier også har rapportert om endofytiske stilksporesopper (Sánchez Márquez *et al.*, 2007). Det har vært vist at antall avdekkede sopp OTE, inkludert funn av stilksporesopp, har vært markant større ved direkte sekvensering enn ved tradisjonell kulturisolering (Aas, 2010). Dette kan enten dreie seg om stilksporesopp, som gjærsopp, som vanskelig lar seg dyrke, eller overflatesopp som ikke har blitt rensset vekk før DNA ekstraksjon av plantevev (Aas, 2010).

Dominans av én eller få sopparter i en undersøkt plante er et typisk mønster innen studier av soppendofytter (Petrini, 1991). *Cladosporium* sp. (OTE 1) stod for 54,7 % av alle ITS sekvenser og ble isolert fra begge sesonger, alle dyrkningsregimer og alle vevstyper. Den fylogenetiske analysen av *Cladosporium* sp. viser at mine isolater faller sammen med ett isolat fra arbeid av Rosa *et al.* (2010) der *Davidiella tassiana* (teleomorf *Cladosporium*

## Diskusjon

*herbarum*) ble isolert som en endofytt. Dekningen av *Cladosporium* sp. i prosentandel var svært lik i de tre dyrkningsregimene. Dette kan indikere at slekten er dominant i timotei uavhengig av vertsplantens næringsstatus. Andre har også påvist *Cladosporium* som en av de mest frekvente slektene innen bl.a. gressfamilien ved bruk av overflatesterilisering og utpoding på PDA (Larran *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2010; Sánchez Márquez *et al.*, 2007; Sánchez Márquez *et al.*, 2010). Slekten er også funnet i andre plantefamilier, noe som tilsier at artene ikke er vertsspesifikke (Sánchez Márquez *et al.*, 2010). Imidlertid er ikke ITS en god nok molekylær markør for å skille nærstående arter av *Cladosporium* inkludert arter innen *Cladosporium herbarum* komplekset (Schubert *et al.*, 2007). Vertsspesifisitet kan derfor ikke tolkes ut fra ITS data. Av samme årsak er det ikke avklart om OTE 1 i dette studiet er en kjent art eller ny endofyttisk linje innen *Cladosporium herbarum* komplekset, eller om OTE 1 i realiteten rommer flere arter. Arter innen *Cladosporium* er kjent for å sporulere svært effektivt, og er på verdensbasis den soppen som hyppigst isoleres fra omgivelsene (Schubert *et al.*, 2007). Kanskje ikke så overraskende er deres luftspredte sporer en vanlig årsak til allergi og astma (Kurup *et al.*, 2002; Rid *et al.*, 2009). Ellers kan det nevnes at kjemiske substanser fra *Cladosporium cladosporioides* kan benyttes innen medisinerer av Alzheimers sykdom (Zhang *et al.*, 2011).

OTE med høy sekvenslikhet til *Phaeosphaeria* (anamorf *Stagonospora* sp.) var den nest vanligste, og ble for det meste isolert fra konvensjonell åker i august. Innenfor den fylogenetiske analysen grupperer OTE 2 med *Phaeosphaeria nodorum*, *Phaeosphaeria avenaria* og *Stagonospora* sp. (figur 11), men deler kun 96 % sekvenslikhet med nærmeste kjente art (*Phaeosphaeria nodorum*, Tabell 1). OTE2 kan derfor representere en unik, og muligens ubeskrevet art. Både *Phaeosphaeria nodorum* og *Phaeosphaeria avenaria* er kjent som patogener på hvete (Bathgate & Loughman, 2001). Sistnevnte er hittil kun beskrevet fra gressfamilien (Sánchez Márquez *et al.*, 2007) og forårsaker celledød og flekker særlig på blader, og gir dermed lavere avling på hvete (Shaw *et al.*, 2008; Sommerhalder *et al.*, 2010; Deller *et al.*, 2011). Arten utnytter stomata som inngangsport i verten og kan penetrere gjennom cellevegger og opptre både inter- og intracellulært (Solomon *et al.*, 2006), den kan også infisere en rekke andre arter innen gressfamilien (Sommerhalder *et al.*, 2010) der den trolig kan ha lignende effekt. *Stagonospora* sp. er vist å være en gressendofytt som etter inokuleringsforsøk ga økt biomasse til *Phragmites australis* (gressfamilien) (Ernst *et al.*, 2003). I samme arbeid ble det også vist at endofyttene ble overført vertikalt og kunne ha

gunstige effekter på spiring av frø. Det kreves videre studier for å avklare hvorvidt OTE 2 fra dette studiet er en mutualistisk endofytt eller latent patogen i timotei.

Innen familien *Sclerotiniacea* finnes mange nekrotrofe patogene arter, og mange av disse er viktige plantepatogener på frukt og bær (Holst-Jensen *et al.*, 1998). *Botrytis* sp. hører til denne familien og kan invadere nesten alle typer plantevev (Rosslénbroich & Stuebler, 2000) gjennom stomata, eller trenge igjennom kutikula ved hjelp av enzymer hvorpå nekrose er et faktum (Staats, 2007). *Botrytis* sp. ble kun isolert fra timoteiaks fra konvensjonell og økologisk åker i august, og ble ved hjelp av Blastsøk gjenkjent som *Botryotinia fuckeliana*. Anamorfen, *Botrytis cinerea* er en av de mest grundige studerte nekrotrofe plantepatogene sopper (van Kan, 2006). Imidlertid kan heller ikke arter av *Botrytis* gjenkjennes tilstrekkelig basert på ITS data alene (Staats *et al.*, 2005), derfor er det uavklart om OTE 3 er en kjent patogen eller en ny art.

### *Fordeling av endofytter i ulike plantevev*

Dette studiet indikerer at det er en forskjell i diversitet og artsfordeling mellom ulike timoteiplantedeler. Den største diversiteten og høyeste forekomsten av OTE ble påvist i blader totalt sett, men dette resultatet kan påvirkes sterkt av at det ikke lot seg gjøre å samle inn aks og stengel fra kulturlandskap i august. Dataene fra konvensjonell og økologisk dyrket åker viser at blader og aks begge rommer en stor forekomst og diversitet av soppendofytter, mens stengel har lave forekomster (figur 15). Flere studier har vist at det er høy diversitet av soppendofytter i blader (Clay, 1990; Fisher *et al.*, 1995; Larran *et al.*, 2007; Sánchez Márquez *et al.*, 2010). Dette kan henge sammen med at dannelsen av fotosynteseprodukter som soppendofytter kan nyttegjøre seg er størst her. En studie på dominerende gressarter i et steppelandskap i Argentina viste at konsentrasjonen av nitrogen, kalium, fosfor og svovel, i tillegg til den totale næringskonsentrasjonen, var høyest i blader (Peri & Lasagno, 2010).

Frø fra gress inneholder mye opplagsnæring, deriblant stivelse som kan utgjøre så mye som 70 % av frøets tørrvekt (Sabelli & Larkins, 2009). Spiring av sporer og infeksjon fra *Botrytis cinerea* stimuleres når sukker er tilstedet (Rui & Hahn, 2007), og som kjent kan stivelse brytes ned til sukker. *Botrytis cinerea* har et bredt spekter av verter og er ellers mye isolert fra blomsterstand og frukt (Rosslénbroich & Stuebler, 2000; Staats, 2007; Sowley *et al.*, 2010; Rui & Hahn, 2007). Dette kan styrke en teori om at OTE 3, som kun ble isolert fra aks, kan

## Diskusjon

tilhøre *Botrytis cinerea*. Likevel er det også vist at denne arten kan forekomme systemisk i verten (Sowley *et al.*, 2010), og ettersom ITS sekvensering ikke er nok for å skille arter innen *Botrytis* sp. kan artsidentiteten til OTE 3 ikke avklares med sikkerhet. *Botrytis cinerea* kan også opptre symptomløst hos verten (Sowley *et al.*, 2010), og man kan spekulere i om timotei i denne studien kan fungere som et reservoar for sopparten, der den ikke forårsaker skade før den invaderer andre plantearter. Til forskjell fra *Botrytis* sp. opptrer OTE 1 (*Cladosporium* sp.) nesten utelukkende i blader, og er hyppigst isolert fra konvensjonell og økologisk åker. Det kan tenkes at dette er en slekt som krever mye næring fra sin vert. Eller det kan også tenkes at det foreligger en nisjedifferensiering mellom *Cladosporium* sp. og *Botrytis* sp., som når de sameksisterer innen samme vert foretrekker separate plantesegmenter.

## *Sesongvariasjon*

Innsamling av timotei i august ga flest isolater, og det bredeste spekteret av arter. GNMDS analysen viser dessuten en klar temporal effekt, der fordelingen av soppendofytter fra juni og august viser en segregering (figur 16 b og 17 b). Det finnes undersøkelser som viser at populasjoner av soppendofytter kan variere med sesong (Petrini, 1991). Det er godt mulig at den store variasjonen i artsantallet mellom juni og august, i dette arbeidet, kan skyldes ulike faktorer innen sesong. For eksempel kan variasjonen av soppendofytter forklares av strategien av deres overføring. Dersom størsteparten av soppendofyttene ble spredt ved vertikal overføring ville man forvente å avdekke alle soppendofytter også tidlig i sesongen. Da ville det dessuten være liten forskjell på mengde soppendofytter tidlig og sent i sesongen. Hvis det derimot i all hovedsak foregår horisontal overføring vil man sannsynligvis se en økning av soppendofytter gjennom sesongen. En stor forskjell på andel avdekket soppendofytter mellom tidlig og sent i sesongen, slik som i denne studien, ville da kunne påvises.

Ellers kan klimatiske faktorer som fuktighet påvirke spredningen og spiring av sporer (Saikkonen *et al.*, 1998), og flere har påpekt en positiv korrelasjon mellom kolonisering av soppendofytter og nedbør (Rodrigues, 1994; Suryanarayanan *et al.*, 2002; Wilson & Carroll, 1994). At nedbør har hatt noe å si også i dette tilfellet antas å være plausibelt ettersom det er langt høyere nedbørsmengde i august (figur V2). Dessuten er det vist at *Stagonospora nodorum*, som er en nær slektning av OTE 2, gir økt antall infeksjoner i hvete ved økt nedbør (Sommerhalder *et al.*, 2010).



En annen sesongbasert faktor kan være planters næringsopptak som hos flere gressarter tenderer til å variere mellom vår og sommer (Peri & Lasagno, 2010). En variert næringsstatus hos en vert vil muligens også avtegne seg i forekomst av soppendofytter.

### *Effekt av dyrkningsregime*

Ut fra GNMDS analysen (16 a og 17 a) ser man at soppendofytter fra økologisk åker og kulturlandskap grupperer seg sammen. Dette viser en klar forskjell i artssammensetning som kan være forårsaket av nitrogentilførsel. I følge Rodriguez *et al.* (2009) er det næringskrevende å inneha mange soppendofytter, og dersom ikke nok næring er tilstede vil verten bli stresset. Konvensjonell og økologisk dyrket timotei er begge dyrkningsmetoder der ekstra næring tilføres, og disse ga opphav til flest isolater totalt sett. Dette selv om man utelukker aks og stengel, ettersom det i andre innsamling var kun blader som var tilgjengelig fra kulturlandskap. Totalmengden av soppendofytter var størst i timotei fra konvensjonelt dyrkningsregime, der det ble gjødslet med 8-10 kg fullgjødsel per dekar. Kanskje er det en korrelasjon mellom mengde tilført næring og mengde soppendofytter. Eller, dersom isolerte soppendofytter er potensielle patogener, kan det tenkes at planter med god næringstilgang også får god forutsetning for å opprettholde et godt forsvar. Terskelen for å påvirkes av stressfaktorer hos planter med god resurstilgang blir muligens høyere enn for planter med dårligere resurstilgang, og disse kan tåle mer. Videre viser soppendofytter fra konvensjonell åker en segregering i henhold til GNMDS analysen. En mulig forklaring på dette er at økologisk åker og kulturlandskap er underlagt flere varierende faktorer enn konvensjonell åker. Husdyrgjødsel er en mer nyansert form for næringstilførsel enn fullgjødsel. Dessuten var det mer innslag av andre plantearter i økologisk åker enn konvensjonell (tabell V3).

Til tross for størst forekomst av soppendofytter innen konvensjonell dyrkning var det likevel relativt lav artsrikdom innen denne dyrkningsformen. Dette ses særlig innen blader der syv OTE ble avdekket sammenlignet med 12 og 14 OTE fra henholdsvis økologisk åker og kulturlandskap (figur 13). Kanskje sporulering på møkk bidrar til infisering av gress, noe som igjen bidrar til en høyere artsrikdom av soppendofytter. Porras-Alfaro *et al.* (2008) studerte soppendofytter i røtter av gresset *Bouteloua gracilis*. De fant at 20 % av deres sekvenser var svært like kjente koprofile sopp. Dette kan være en alternativ fase i livssyklusen til enkelte soppendofytter. De antok også at det var mulig for sporer å overleve et fordøyelsessystem. Ettersom økologisk åker gjødsles med dyremøkk er det tenkelig at flere arter av potensielle

## Diskusjon

soppendofytter innføres på denne måten. Et varierende mangfold av andre plantearter er nok også et bidrag til større diversitet av soppendofytter. Et slikt habitat vil kanskje ha et bredere utvalg av potensielle soppendofytter som kan infisere timotei. Dette er elementer som kan forklare en forholdsvis høy artsrikhet av soppendofytter fra økologisk dyrkning og kulturlandskap. Hypotesen om at diversiteten av soppendofytter øker med økende plantediversitet i habitatet får dermed støtte fra dette studiet.

Tilførsel av større mengder nitrogen svekker, i følge Matsuyama (1975), motstandsdyktigheten mot sykdom forårsaket av en spesiell sopp hos ris. Den mekaniske motstanden i celleveggene reduseres fordi nitrogen reduserer total mengde av karbohydrater, hemicellulose og ligning i risplantene. I tillegg ble det observert at høy nitrogentilførsel økte forekomst av lesjoner, særlig i blader. Støtte for svakere plantestruktur finnes også hos Van Arendonk *et al.* (1997) og Bélanger og McQueen (1998) der sistnevnte viste at timotei ble mer lettfordøyelig for dyr ved tilførsel av store mengder nitrogen. De mente at konsentrasjonen av komponenter i cellevegg sank og at fordøyeligheten dermed økte. Som en respons på dette er det sannsynlig at lekkasjer av næring fra planteceller gir en fordel for intercellulære soppendofytter, og at spredning av soppendofytter innad i plantevevet blir enklere hos konvensjonelt dyrket timotei. Man kan anta at nitrogengjødsling vil gi en tettere åker, og Mitchell *et al.* (2002) og Burdon og Chilvers (1982) påpeker at tettheten av verter også spiller inn på spredning av sykdom. Et habitat med tett fordeling av verter hadde høyere risiko for mye sykdom enn et habitat med lav tetthet av verter. I tillegg viste Mitchell *et al.* (2002) at lav artsrikdom av planter i habitatet kunne bidra til økt forekomst av sykdom, ettersom en større diversitet av plantearter ville fortynne utbredelsen av verter for en gitt sykdom som var spesifikk for få plantearter. Som tidligere nevnt kan flere soppendofytter øke resistensen mot sykdom i sine planteverter. Motstridende nok kan også enkelte soppendofytter være latente patogener som kan forårsake sykdom. Ettersom nitrogengjødsling angivelig gir svakere cellestruktur kan man reflektere over om dette forenkler invadering av enkelte potensielt patogene soppendofytter. De tre vanligste OTE i denne studien tilhører alle slekter som blant annet inneholder patogene arter. De ble i hovedsak isolert fra konvensjonell og økologisk åker som også var de mest tettvokste habitatene med relativt lavt artsmangfold av andre planter (tabell V3). Rollen til de nevnte OTE, som soppendofytter eller latente patogener, er likevel uavklart, og som nevnt er det mulig at timotei kan fungere som et mellomledd der de samme OTE kan være problematiske for andre jordbruksvekster.

*Metodiske forhold*

I denne oppgaven ble det avdekket forekomst av flere ulike arter sopp i symptomløst plantevev fra timotei. Prosessen har basert seg på overflatesterilisering av plantevev og isolering av mycelvekst på maltekstrakt-basert agar (MYSA). Maltekstraktagar er kjent for å gi opphav til et stort antall endofyttisolater sammenlignet med andre media (Arnold *et al.*, 2000). Det ble ikke brukt klassisk maltekstraktagar i dette studiet, men et maltekstrakt-basert medium (MYSA) som er spesialtilpasset for kvantifisering av sopp fra dyrefôr, spesielt surfôr og høyballer (Skaar & Stenwig, 1996). Dette mediet er vist å gi opphav til minst like mange soppkolonier som maltekstraktagar, men er bedre egnet enn maltekstraktagar fordi koloniene blir kompakte og mindre i diameter, noe som vil minske problemer med overvekst. I tillegg hemmes konidieproduksjon hos noen klassiske kontaminanter på MYSA, noe som ikke skjer på klassisk maltekstraktagar (Skaar & Stenwig, 1996). Det er også vist at MYSA effektivt hemmer bakterievekst uten å hemme soppvekst. Likevel er det mulig at dyrkning på MYSA alene kan gi visse begrensninger med hensyn til antall isolater, ettersom det er sannsynlig at flere sopparter er spesifikke på ulike typer vekstmedium (Guo *et al.*, 2001). Flere dyrkningsmedier kunne vært testet, men både tid og ressurser ga ikke rom for dette.

Overflatesterilisering med klorin og etanol har vist seg å være en effektiv metode for å drepe den flora som måtte befinne seg på planteoverflaten (Schulz *et al.*, 1993). Blant *Cladosporium* sp. var det 12 kontaminanter fra luft og tre fra vannkontroll, men det er lite trolig at dette gir grunn for å tvile på overflatesteriliseringen. Antagelig var plantematerialet, før det ble overflatesterilisert, kilde til luftkontamineringen ettersom det ikke kan utelukkes at *Cladosporium* sp. sporulerer på planteoverflaten. Vannkontroller med kun tre kontaminanter viser at overflatesteriliseringen i de aller fleste tilfeller har fungert. Det virker dessuten urimelig at den store mengden av *Cladosporium* sp. som vokste ut fra plantevev skulle komme av overflatekontaminasjon. *Cladosporium* sp. ble forøvrig isolert fra plantevev ved flere anledninger der de ikke ble påvist i luft eller vannkontroll.

Noen timoteisegmenter ga ingen isolater, mens andre ga flere, noe som kan være vanlig i endofytt studier (Shipunov *et al.*, 2008), likevel er fragmentstørrelser av stor betydning innen avdekking av soppendofytter i følge Gamboa *et al.* (2002). En reduksjon av fragmentstørrelse førte til økt antall isolater av soppendofytter i deres studie, der fragmenter på 2,5 mm ga flest isolater. Videre mente de at konkurransen mellom soppendofytter minskes når kuttflatearealet blir større, ettersom den første soppen som gror ut av snittflaten kan inhibere veksten til andre

## Diskusjon

sopp. I denne oppgaven er plantevevet kuttet i 2-3 cm store biter. Muligens kunne flere sopp blitt isolert dersom bitene hadde vært mindre. Enkelte sopp kan dessuten vokse svært fort fra plantevev og ut i mediet og følgelig utkonkurrere de mer langsomt voksende artene (Arnold & Lutzoni, 2007). De steriliserte plantebitene ble i dette tilfellet observert i fem uker, noe som kan være en kort periode, men ingen ny mycelvekst ble observert da isoleringsskålene flere måneder senere ble kastet.

### *Konkluderende bemerkninger*

I dette arbeidet ble det påvist en klar effekt av sesong og behandling på artssammensetning av soppendofytter i timotei. Det er også sannsynlig at andre faktorer kan spille inn på utbredelsen av soppendofytter. For eksempel alder på marken, hva som er dyrket tidligere, klimatiske forhold, pH og høyde og størrelse på planteindivid. Dette var det ikke rom for å ta hensyn til i denne omgang, men kan absolutt være viktige vinklinger for videre studier. Det kunne også være interessant å sekvensere de dominante OTE fra dette studiet med andre molekyllære markører, som gjort av Schubert *et al.* (2007). Slik kunne det avklares om hvilke arter det dreide seg om, og om disse var kjente eller nye. Det kunne også avdekkes om en ITS-basert OTE da ville splittes til flere.

Denne oppgaven indikerer at norsk dyrket timotei ikke inneholder kjente toksinproduserende soppendofytter, i hvert fall ikke innen undersøkte studieområde. Det kan dermed antas å være godt egnet som dyrefôr. Om det er vesentlig variasjon innen dominerende soppendofytter i timotei mellom geografiske områder gjenstår å undersøke. Videre kan man anta at en timoteiavling fra juni kan ha bedre holdbarhet enn en avling fra august, særlig ved fuktutsatt lagring, ettersom første timoteiavling inneholder betydelig mindre sopp enn andre avling.

## Referanser

- Aas AB. 2010.** Diversity and species composition of fungal endophytes in *Avenella flexuosa* under different sheep grazing regimes. Masteroppgave, Biologisk Institutt, Universitetet i Oslo, Norge.
- Arnold AE, Maynard Z, Gilbert GS, Coley PD, Kursar TA. 2000.** Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters* **3**: 267-274.
- Arnold AE, Lutzoni F. 2007.** Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* **88**: 541-549.
- Bacon WC, White FJ, Jr. 1994.** Stains, media, and procedures for analyzing endophytes. In: *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*. CRC Press.
- Bassoli A, Borgonovo G, Busnelli G. 2007.** Alkaloids and the bitter taste. In: *Modern Alkaloids: structure, isolation, synthesis and biology*. Eds. Fattorusso E. and Tagliatella-Scafati O. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Bathgate J, Loughman R. 2001.** Ascospores are a source of inoculum of *Phaeosphaeria nodorum*, *P. avenaria* f. sp. *avenaria* and *Mycosphaerella graminicola* in Western Australia. *Australasian Plant Pathology* **30**: 317-322.
- Bélanger G, McQueen RE. 1998.** Analysis of the nutritive value of timothy grown with varying N nutrition. *Grass and Forage Science* **53**: 109-119.
- Bensch K, Groenewald JZ, Dijksterhuis J, Starink-Willemse M, Andersen B, Summerell BA, Shin HD, Dugan FM, Schroers HJ, Braun U, Crous PW. 2010.** Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*). *Studies in Mycology* **67**: 1-94.
- Brem D, Leuchtmann A. 2002.** Intraspecific competition of endophyte infected vs uninfected plants of two woodland grass species. *Oikos* **96**: 281-290.
- Burdon JJ, Chilvers GA. 1982.** Host density as a factor in plant disease ecology. *Annual Review of Phytopathology* **20**: 143-166.
- Camara MPS, Palm ME, van Berkum P, O'Neill NR. 2002.** Molecular phylogeny of *Leptosphaeria* and *Phaeosphaeria*. *Mycologia* **94**: 630-640.
- Cheplick PG, Faeth HS. 2009.** *Ecology and evolution of the grass-endophyte symbiosis*. Oxford University Press.
- Clay K. 1988.** Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* **69**: 10-16.
- Clay K. 1990.** Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Ecology and Systematics* **21**: 275-297.
- Clay K, Hardy TN, Hammond AM. 1985.** Fungal endophytes of grasses and their effects on an insect herbivore. *Oecologia* **66**: 1-5.

- Deller S, Hammond-Kosack KE, Rudd JJ. 2011.** The complex interactions between host immunity and non-biotrophic fungal pathogens of wheat leaves. *Journal of Plant Physiology* **168**: 63-71.
- Devarajan PT, Suryanarayanan TS, Geetha V. 2002.** Endophytic fungi associated with the tropical seagrass *Halophila ovalis* (Hydrocharitaceae). *Indian Journal of Marine Sciences* **31**: 73-74.
- Ding T, Jiang T, Zhou J, Xu L, Gao ZM. 2010.** Evaluation of antimicrobial activity of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae). *Genetics and Molecular research* **9**: 2104-2112.
- Ernst M, Mendgen KW, Wirsal SGR. 2003.** Endophytic fungal mutualists: seed-borne *Stagonospora* Spp. enhance reed biomass production in axenic microcosms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 580-587.
- Fisher PJ, Graf F, Petrini LE, Sutton BC, Wookey PA. 1995.** Fungal endophytes of *Dryas octopetala* from a high arctic polar semidesert and from the Swiss Alps. *Mycologia* **87**: 319-323.
- Galey FD, Tracy ML, Craigmill AL, Barr BC, Markegard G, Peterson R, Oconnor M. 1991.** Staggers induced by consumption of perennial ryegrass in cattle and sheep from northern California. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **199**: 466-470.
- Gamboa M, Laureano S, Bayman P. 2002.** Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: does size matter? *Mycopathologia* **156**: 41-45.
- Gardes M, Bruns TD. 1993.** ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* **2**: 113-118.
- Guo LD, Hyde KD, Liew ECY. 2001.** Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **20**: 1-13.
- Hall TA. 1999** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. [v.7.0]. Nucleic Acids Symposium Series 95-98.  
Ref Type: Computer Program
- Harborne JB. 1993.** Plant toxins and their effects on animals. In: *Introduction to ecological biochemistry*. Academic Press, 71-101.
- Havstad LT, Aamlid TS. 2002.** Use of regrowth for forage in crops of timothy (*Phleum pratense* L.) cv. Grindstad grown for seed in Norway. *Grass and Forage Science* **57**: 147-156.
- Higgins KL, Coley P, Kursar T, Arnold AE. 2011.** Culturing and direct PCR suggest prevalent host-generalism among diverse fungal endophytes of tropical forest grasses. *Mycologia* **103**: 247-260.
- Höglind M, Schapendonk AHCM, Van Oijen M. 2001.** Timothy growth in Scandinavia: combining quantitative information and simulation modelling. *New Phytologist* **151**: 355-367.

- Holst-Jensen A, Vaage M, Schumacher T. 1998.** An approximation to the phylogeny of *Sclerotinia* and related genera. *Nordic Journal of Botany* **18**: 705-719.
- Hyde KD, Soyong K. 2008.** The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* **33**: 163-173.
- Krings M, Taylor TN, Hass H, Kerp H, Dotzler N, Hermsen EJ. 2007.** Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytologist* **174**: 648-657.
- Kurup VP, Shen HD, Vijay H. 2002.** Immunobiology of fungal allergens. *International Archives of Allergy and Immunology* **129**: 181-188.
- Larran S, Perelló A, Simón M, Moreno V. 2007.** The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**: 565-572.
- Leuchtmann A, Schardl CL. 1998.** Mating compatibility and phylogenetic relationships among two new species of *Epichloë* and other congeneric European species. *Mycological Research* **102**: 1169-1182.
- Ligrone R. 1988.** Ultrastructure of a fungal endophyte in *Phaeoceros laevis* (L.) Prosk. (Anthocerotophyta). *Botanical Gazette* **149**: 92-100.
- Liu CH, Zou WX, Lu H, Tan RX. 2001.** Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. *Journal of Biotechnology* **88**: 277-282.
- Matsuyama N. 1975.** The effect of ample nitrogen fertilizer on cell-wall materials and its significance to rice blast disease. *Annual Phytopathological Society of Japan* **41**.
- Meteorologisk institutt, NRK. [www.yr.no](http://www.yr.no).  
[http://www.yr.no/sted/Norge/Oppland/Øystre\\_Slidle/Volbu/statistikk.html](http://www.yr.no/sted/Norge/Oppland/Øystre_Slidle/Volbu/statistikk.html) . 2009.  
 Ref Type: Electronic Citation
- Mitchell CE, Tilman D, Groth JV. 2002.** Effects of grassland plant species diversity, abundance, and composition on foliar fungal disease. *Ecology* **83**: 1713-1726.
- Novas VM, Collantes M, Cabral D. 2007.** Environmental effects on grass-endophyte associations in the harsh conditions of south Patagonia. *FEMS Microbiology Ecology* **61**: 164-173.
- Pan JJ, Baumgarten AM, May G. 2008.** Effects of host plant environment and *Ustilago maydis* infection on the fungal endophyte community of maize (*Zea mays*). *New Phytologist* **178**: 147-156.
- Peri PL, Lasagno RG. 2010.** Biomass, carbon and nutrient storage for dominant grasses of cold temperate steppe grasslands in southern Patagonia, Argentina. *Journal of Arid Environments* **74**: 23-34.
- Petrini O. 1991.** Fungal endophytes of tree leaves. In: *Microbial ecology of leaves*. Eds. Andrews J. H., Hirano S. S. New York: Springer-Verlag, 179-197.
- Petroski JR, Powell GR, Clay K. 1992.** Alkaloids of *Stipa robusta* (Sleepygrass) infected with an *Acremonium* endophyte. *Natural toxins* **1**: 84-88.

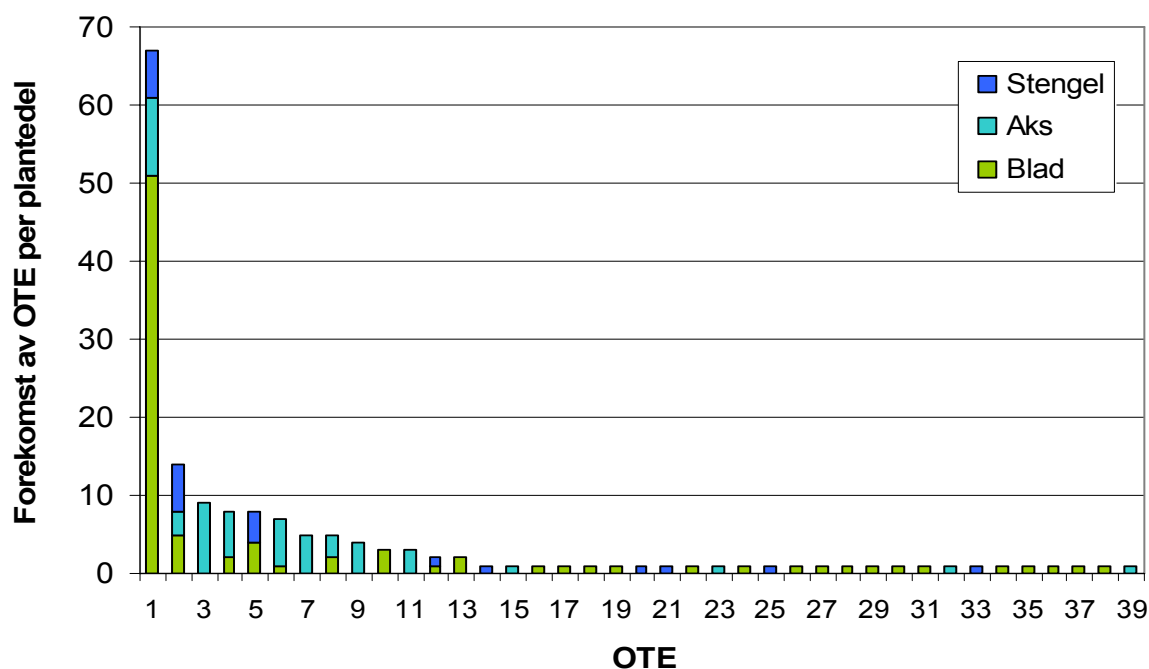
- Photita W, Lumyong S, Lumyong P, McKenzie EHC, Hyde KD. 2004.** Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? *Fungal Diversity* **16**: 131-140.
- Porras-Alfaro A, Herrera J, Sinsabaugh RL, Odenbach KJ, Lowrey T, Natvig DO. 2008.** Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 2805-2813.
- Rid R, Índer K, Hawranek T, Laimer M, Bauer JW, Holler C, Simon-Nobbe B, Breitenbach M. 2009.** Isolation and immunological characterization of a novel *Cladosporium herbarum* allergen structurally homologous to the [alpha]/[beta] hydrolase fold superfamily. *Molecular Immunology* **47**: 1366-1377.
- Rodrigues KF. 1994.** The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia* **86**: 376-385.
- Rodriguez RJ, White Jr JF, Arnold AE, Redman RS. 2009.** Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* **182**: 314-330.
- Rosa LH, Almeida Vieira MdL, Santiago IF, Rosa CA. 2010.** Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (*Caryophyllaceae*) in Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology* **73**: 178-189.
- Rosslenbroich HJ, Stuebler D. 2000.** *Botrytis cinerea* - history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* **19**: 557-561.
- Rudgers JA, Afkhami ME, Rúa MA, Davitt AJ, Hammer S, Huguet VM. 2009.** A fungus among us: broad patterns of endophyte distribution in the grasses. *Ecology* **90**: 1531-1539.
- Rudgers JA, Koslow JM, Clay K. 2004.** Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. *Ecology Letters* **7**: 42-51.
- Rui O, Hahn M. 2007.** The *Botrytis cinerea* hexokinase, Hxk1, but not the glucokinase, Glk1, is required for normal growth and sugar metabolism, and for pathogenicity on fruits. *Microbiology-Sgm* **153**: 2791-2802.
- Sabelli PA, Larkins BA. 2009.** The development of endosperm in grasses. *Plant Physiology* **149**: 14-26.
- Saikkonen K, Faeth SH, Helander M, Sullivan TJ. 1998.** Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**: 319-343.
- Saikkonen K, Lehtonen P, Helander M, Koricheva J, Faeth SH. 2006.** Model systems in ecology: dissecting the endophyte-grass literature. *Trends in Plant Science* **11**: 428-433.
- Saikkonen K, Wali P, Helander M, Faeth SH. 2004.** Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science* **9**: 275-280.
- Sánchez Márquez S, Bills G, Domínguez Acuña L, Zabalgoceazcoa I. 2010.** Endophytic mycobiota of leaves and roots of the grass *Holcus lanatus*. *Fungal Diversity* **41**: 115-123.
- Sánchez Márquez S, Bills G, Zabalgoceazcoa I. 2007.** The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. *Fungal Diversity* **27**: 171-195.



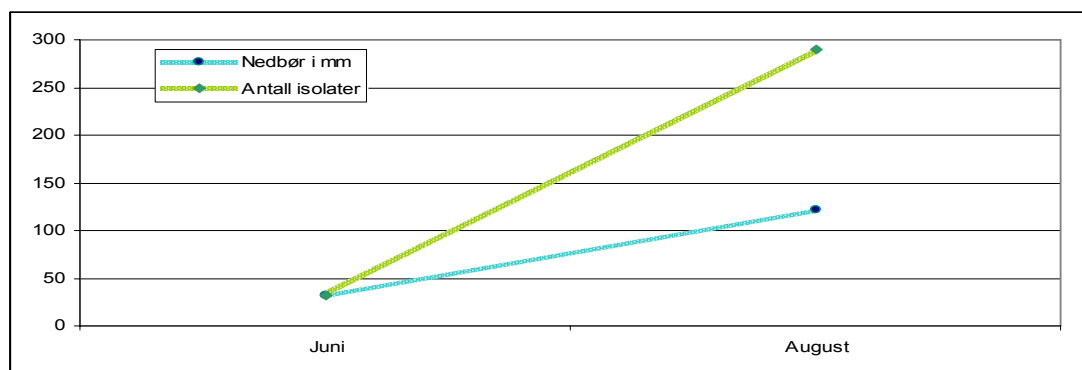
- Schubert K, Groenewald JZ, Braun U, Dijksterhuis J, Starink M, Hill CF, Zalar P, de Hoog GS, Crous PW. 2007.** Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Studies in Mycology* **58**: 105-156.
- Schulz B, Wanke U, Draeger S, Aust HJ. 1993.** Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research* **97**: 1447-1450.
- Schulz B, Boyle C. 2005.** The endophytic continuum. *Mycological Research* **109**: 661-686.
- Seifert KA. 2009.** Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* **9**: 83-89.
- Seto Y, Takahashi K, Matsuura H, Kogami Y, Yada H, Yoshihara T, Nabeta K. 2007.** Novel cyclic peptide, epichlicin, from the endophytic fungus, *Epichloe typhina*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **71**: 1470-1475.
- Shaw MW, Bearechell SJ, Fitt BDL, Fraaije BA. 2008.** Long-term relationships between environment and abundance in wheat of *Phaeosphaeria nodorum* and *Mycosphaerella graminicola*. *New Phytologist* **177**: 229-238.
- Shipunov A, Newcombe G, Raghavendra AKH, Anderson CL. 2008.** Hidden diversity of endophytic fungi in an invasive plant. *American Journal of Botany* **95**: 1096-1108.
- Skaar I, Stenwig H. 1996.** Malt-yeast extract-sucrose agar, a suitable medium for enumeration and isolation of fungi from silage. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 3614-3619.
- Solomon PS, Lowe RGT, Tan KC, Waters ODC, Oliver RP. 2006.** *Stagonospora nodorum*: cause of *Stagonospora nodorum* blotch of wheat. *Molecular Plant Pathology* **7**: 147-156.
- Sommerhalder RJ, McDonald BA, Mascher F, Zhan J. 2010.** Sexual recombinants make a significant contribution to epidemics caused by the wheat pathogen *Phaeosphaeria nodorum*. *Phytopathology* **100**: 855-862.
- Sowley E, Dewey F, Shaw M. 2010.** Persistent, symptomless, systemic, and seed-borne infection of lettuce by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **126**: 61-71.
- Staats M. 2007.** *Botrytis species on flower bulb crops: phylogeny, genetic variation and host specificity*. Met lit. opg. - Met samenvatting in het Engels en Nederlands; Proefschrift Wageningen, s.n.].
- Staats M, van Baarlen P, van Kan JAL. 2005.** Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution* **22**: 333-346.
- Suryanarayanan TS, Murali TS, Venkatesan G. 2002.** Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. *Canadian Journal of Botany* **80**: 818-826.

- Suryanarayanan TS, Wittlinger SK, Faeth SH. 2005.** Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. *Mycological Research* **109**: 635-639.
- Tamura K, Peterson D., Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011.** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*.
- Tan RX, Zou WX. 2001.** Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports* **18**: 448-459.
- Tintjer T, Leuchtman A, Clay K. 2008.** Variation in horizontal and vertical transmission of the endophyte *Epichloë elymi* infecting the grass *Elymus hystrix*. *New Phytologist* **179**: 236-246.
- Tsing AL. 2005.** *Friction: an ethnography of global connection*. Princeton University Press.
- Ugland KI, Gray JS, Ellingsen KE. 2003.** The species accumulation curve and estimation of species richness. *Journal of Animal Ecology* **72**: 888-897.
- van Kan JAL. 2006.** Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* **11**: 247-253.
- Van Arendonk JJCM, Niemann GJ, Boon JJ, Lambers H. 1997.** Effects of nitrogen supply on the anatomy and chemical composition of leaves of four grass species belonging to the genus *Poa*, as determined by image-processing analysis and pyrolysis mass spectrometry. *Plant Cell and Environment* **20**: 881-897.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols a guide to methods and applications*. Eds. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., and White T. J. San Diego: Academic Press, 315-322.
- Wilson D, Carroll GC. 1994.** Infection studies of *Discula quercina*, an endophyte of *Quercus garryana*. *Mycologia* **86**: 635-647.
- Wilson D. 1995.** Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* **73**: 274-276.
- Wink M. 2008.** Ecological roles of alkaloids. In: *Modern alkaloids*. Eds. Fattorusso E. and Tagliatela-Scafati O. Wiley-VCH, 3-23.
- Zalar P, de Hoog GS, Schroers HJ, Crous PW, Groenewald JZ, Gunde-Cimerman N. 2007.** Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Studies in Mycology* **58**: 157-183.
- Zhang Z, Zeng Q, Yan R, Wang Y, Zou Z, Zhu D. 2011.** Endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides* LF70 from *Huperzia serrata* produces Huperzine A. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **27**: 479-486.

## Vedlegg



**Figur V1:** Stolpediagram som viser forekomsten av OTE for de ulike plantedelene aks, stengel og blad.



**Figur V2:** Nedbør og antall isolater av soppendofytter antas å ha en sammenheng. Data for nedbør er registrert i Østre Slidre i Voldbu og hentet fra [www.yr.no](http://www.yr.no) (Meteorologisk institutt & NRK, 2009)

**Tabell V1: Mediekatalog**

Oppskrift til en standardporsjon PDA		
<i>Produktnavn</i>	<i>Produkt nr</i>	
Bacto Potato Dextrose Agar	Difco 0013	39,0 g
Potato Dextrose Agar	Oxoid CM 139	39,0 g
Potato Dextrose Agar	Merck 1.10130	39,0 g
Destillert vann		1,0 L

Oppskrift til en standardporsjon MYSA		
<i>Produktnavn</i>	<i>Produkt nr</i>	
Maltekstrakt	Moss aktie-bryggeri	15 g
Bacto Tryptone	Difco 0123	2,0 g
Bacto Oxgall,	Difco 0128	2,0 g
Sakkarose	Merck 1.07687	30 g
Difco Yeast Extract	Difco 0127	5,0 g
Natriumnitrat, p.a $\text{NaNO}_3$	Merck 1.06537	0,5 g
Agar Granulated	Difco 0145	20 g
Vann		1,0 L
Kloramfenikol, 5 mg/ml	KA K 0007	10,0 ml
Klortetrasyklin, 5 mg/ml	KA K 0010	10,0 ml

Oppskrift til en standardporsjon Kloramfenikol 0,5 %		
<i>Produktnavn</i>	<i>Produkt nr</i>	
<b>Alt 1. Kloramfenikol: 5 mg/ml (0,5 %)</b>		
Kloramfenikol	Sigma C 0378	0,5 g
Rektifisert sprit, 96%		100 ml
<b>Alt 2. Kloramfenikol: 50 mg/ml (5,0 %)</b>		
Kloramfenikol	Sigma C 0378	5,0 g
Rektifisert sprit, 96%		100 ml
<b>Alt 3. Kloramfenikol:</b>		
Kloramfenikol	Sigma C 0378	
Rektifisert sprit, 96%		

Oppskrift til en standardporsjon Klortetrasyklin		
<i>Produktnavn</i>	<i>Produkt nr</i>	
<b>Alt 1. Klortetrasyklin 5 mg/ml (0,5 %)</b>		
Klortetrasyklin,	Sigma C 4881	2,5 g
Sterilt, destillert vann		500 ml
<b>Alt 2. Klortetrasyklin 10 mg/ml</b>		
Klortetrasyklin,	Sigma C 4881	1,0 g
Sterilt, destillert vann		100 ml
<b>Alt 3. Klortetrasyklin</b>		
Klortetrasyklin,	Sigma C 4881	
Sterilt destillert vann		

Tabell V2: Referansesekvenser i parsimoni analyse.

GenBank-nummer	Art / type	Stamme	Opphav	Referanse
EF679376	<i>C. macrocarpum</i> *	CPC12755	<i>Spinacia oleracea</i>	(Schubert <i>et al.</i> , 2007)
FJ911883	<i>D. tassiana</i>		<i>Colobanthus quitensis</i>	(Rosa <i>et al.</i> , 2010)
EF679361	<i>C. herbarum</i>	CPC11603	<i>Delphinium barbeyi</i>	(Schubert <i>et al.</i> , 2007)
EF679363	<i>C. herbarum</i> *	CPC12177	<i>Hordeum vulgare</i>	(Schubert <i>et al.</i> , 2007)
EF679373	<i>C. macrocarpum</i>	CPC11817	<i>Corylus</i> sp.	(Schubert <i>et al.</i> , 2007)
EF679337	<i>C. bruhnei</i>	CBS159.54	Menneskehud	(Schubert <i>et al.</i> , 2007)
EF679350	<i>C. bruhnei</i> *	CBS1216.24	<i>Hordeum vulgare</i>	(Schubert <i>et al.</i> , 2007)
EF679352	<i>C. bruhnei</i>	CPC12921	<i>Eucalyptus</i> sp.	(Schubert <i>et al.</i> , 2007)
EF679381	<i>C. ossifragi</i> *	CBS842.91	<i>Narthecium ossifragum</i>	(Schubert <i>et al.</i> , 2007)
EF679401	<i>C. tenellum</i> *	CPC12053	Saltholdig vann	(Schubert <i>et al.</i> , 2007)
EF679388	<i>C. spinulosum</i> *	CPC12040	Saltholdig vann	(Schubert <i>et al.</i> , 2007)
DQ780406	<i>C. spinulosum</i> *	EXF334	Saltholdig vann	(Zalar <i>et al.</i> , 2007)
EF679384	<i>C. ramotenellum</i> *	CPC12043	Saltholdig vann	(Schubert <i>et al.</i> , 2007)
GU599165	<i>Cladosporium endophyte</i>	LF70	<i>Huperzia serrata</i> .	(Zhang <i>et al.</i> , 2011)
AY251075	<i>C. colocasiae</i>	CBS115191	<i>Colocasia esculenta</i>	(Bensch <i>et al.</i> , 2010)
HM148118	<i>C. oxysporum</i>	CBS125991	Jord	(Bensch <i>et al.</i> , 2010)
HM148197	<i>C. tenuissimum</i> *	CBS125995	<i>Lagerstroemia</i> sp.	(Bensch <i>et al.</i> , 2010)
HM148061	<i>C. cladosporioides</i>	CBS113746	Kirsebær	(Bensch <i>et al.</i> , 2010)
HM148057	<i>C. cladosporioides</i>	CBS30684	Sporer fra <i>Puccinia allii</i>	(Bensch <i>et al.</i> , 2010)
HM148006	<i>C. cladosporioides</i>	CBS113740	Drue	(Bensch <i>et al.</i> , 2010)
HM147995	<i>C. angustisporum</i> *	CBS125983	<i>Alloxylon wickhamii</i>	(Bensch <i>et al.</i> , 2010)
HM148158	<i>C. pseudocladosporioides</i> *	CBS125993	Utendørs luft	(Bensch <i>et al.</i> , 2010)
HM148099	<i>C. inversicolor</i>	CBS13129	<i>Triticum aestivum</i>	(Bensch <i>et al.</i> , 2010)
HM148079	<i>C. delicatulum</i>	CBS126342	Innendørs luft	(Bensch <i>et al.</i> , 2010)
HM148053	<i>C. cladosporioides</i>	CBS116744	Blader fra <i>Acer pseudoplatanus</i>	(Bensch <i>et al.</i> , 2010)
HM148003	<i>C. cladosporioides</i> *	CBS112388	Innendørs luft	(Bensch <i>et al.</i> , 2010)
EF679354	<i>C. cladosporioides</i>	CBS109082	<i>Silene maritima</i>	(Bensch <i>et al.</i> , 2010)
HM148068	<i>C. cucumerinum</i>	CBS10823	<i>Cucumis sativus</i>	(Bensch <i>et al.</i> , 2010)
DQ780386	<i>C. psychrotolerans</i> *	CBS119412	Saltholdig vann	(Zalar <i>et al.</i> , 2007)

DQ780388	<i>C. fusiforme</i>	CBS119414	Saltholdig vann	(Zalar <i>et al.</i> , 2007)
DQ780374	<i>C. salinae</i> *	CBS119413	Saltholdig vann	(Zalar <i>et al.</i> , 2007)
AF 439477	<i>Phaeosphaeria culmorum</i>	CBS 569.86	<i>Arrhenatherum elatius</i>	(Camara <i>et al.</i> , 2002)
AJ 496626	<i>Stagonospora sp. endophyte</i>	4/99-5	<i>Phragmites australis</i>	(Ernst <i>et al.</i> , 2003)
EF 505604	Uncultured endophytic fungus		<i>Zea mays</i>	(Pan <i>et al.</i> , 2008)
AF 439508	<i>Phaeosphaeria vagans</i>	CBS 604.86	<i>Calamagrostis arundinacea</i>	(Camara <i>et al.</i> , 2002)
AF 439489	<i>Phaeosphaeria lindii</i>	CBS 607.86	<i>Equisetum hyemale</i>	(Camara <i>et al.</i> , 2002)
EF 505595	Uncultured endophytic fungus		<i>Zea mays</i>	(Pan <i>et al.</i> , 2008)
AF 439490	<i>Phaeosphaeria luctuosa</i>	CBS 577.86	<i>Zea mays</i>	(Camara <i>et al.</i> , 2002)
AF 439484	<i>Phaeosphaeria herpotrichoides</i>	CBS 588.86	<i>Melica ciliata</i>	(Camara <i>et al.</i> , 2002)
AF 439497	<i>Phaeosphaeria phragmitis</i>	CBS 578.86	<i>Phragmites australis</i>	(Camara <i>et al.</i> , 2002)
AJ 496631	<i>Phaeosphaeria phragmitis</i>	CBS 578.86	<i>Phragmites australis</i>	(Ernst <i>et al.</i> , 2003)
AJ 496632	<i>Phaeosphaeria pontiformis</i>	CBS 589.86	<i>Phragmites australis</i>	(Ernst <i>et al.</i> , 2003)
AF 439491	<i>Phaeosphaeria lycopodina</i>	CBS 599.86	<i>Lycopodium annotinum</i>	(Camara <i>et al.</i> , 2002)
AJ 496629	<i>Phaeosphaeria eustoma</i>	CBS 337.86	<i>Phragmites australis</i>	(Ernst <i>et al.</i> , 2003)
AF 439478	<i>Phaeosphaeria dennisiana</i>	CBS 598.86	<i>Minuartia sedoides</i>	(Camara <i>et al.</i> , 2002)
AF 439496	<i>Phaeosphaeria padellana</i>	CBS 606.86	<i>Trisetum distichophyllum</i>	(Camara <i>et al.</i> , 2002)
AF 439494	<i>Phaeosphaeria oreochloae</i>	CBS 457.84	<i>Sesleria disticha</i>	(Camara <i>et al.</i> , 2002)
AF 439471	<i>Phaeosphaeria alpina</i>	CBS 456.84	<i>Phleum alpinum</i>	(Camara <i>et al.</i> , 2002)
AJ 496627	<i>Stagonospora sp. endophyte</i>	4/99-18	<i>Phragmites australis</i>	(Ernst <i>et al.</i> , 2003)
AF 439472	<i>Phaeosphaeria avenaria</i>	ATCC 18596	<i>Triticum sp.</i>	(Camara <i>et al.</i> , 2002)
AF 439493	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	CBS 1101.09	<i>Lolium perenne</i>	(Camara <i>et al.</i> , 2002)
AJ 496625	<i>Stagonospora sp. endophyte</i>	4/99-1	<i>Phragmites australis</i>	(Ernst <i>et al.</i> , 2003)
AJ 496630	<i>Stagonospora neglecta</i>	CBS 343.86	<i>Phragmites australis</i>	(Ernst <i>et al.</i> , 2003)
AF 250829	<i>Paraphaeosphaeria michotii</i>	CBS 652.86	<i>Typha latifolia</i>	(Camara <i>et al.</i> , 2002)

---

\*Ex-type kulturer

**Tabell V3: Observerte arter ved innsamling av timotei (*Phleum pratense*)**

Konvensjonell åker	Økologisk åker	Kulturlandskap
Engrapp ( <i>Poa pratensis</i> )	Engsmelle ( <i>Silene vulgaris</i> )	Engkvein ( <i>Agrostis capillaris</i> )
Engsvingel ( <i>Festuca pratensis</i> )	Engsvingel ( <i>Festuca pratensis</i> )	Engrapp ( <i>Poa pratensis</i> )
Tunrapp ( <i>Poa annua</i> )	Løvetann ( <i>Taraxacum</i> sp.)	Engreverumpe ( <i>Alopecurus pratensis</i> )
	Rød jonsokblom ( <i>Silene dioica</i> )	Engsoleie ( <i>Ranunculus acris</i> )
	Rødkløver ( <i>Trifolium pratense</i> )	Engsvingel ( <i>Festuca pratensis</i> )
	Stemorsblomst ( <i>Viola tricolor</i> )	Engsyre ( <i>Rumex acetosa</i> )
		Forglemmegei ( <i>Myosotis</i> sp.)
		Fuglevikke ( <i>Vicia cracca</i> )
		Gjerdevikke ( <i>Vicia sepium</i> )
		Hundekjeks ( <i>Anthriscus sylvestris</i> )
		Hvitkløver ( <i>Trifolium repens</i> )
		Karve ( <i>Carum carvi</i> )
		Løvetann ( <i>Taraxacum</i> sp.)
		Marikåpe ( <i>Alchemilla</i> sp.)
		Ryllik ( <i>Achillea</i> sp.)
		Storkenebb ( <i>Geraniaceae</i> sp.)